

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA P-GLYCOPROTÉINE :  
EFFET DES COUMARINS ET DU NIVEAU D'INTERACTION ENTRE LA P-GP ET LA  
CAVÉOLINE-1 SUR LES ACTIVITÉS ASSOCIÉES À LA P-GP

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
CHANTAL FOURNIER

Janvier 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de recherche, le Dr Richard Béliveau, de m'avoir accueillie si chaleureusement dans son laboratoire et je lui adresse toute ma reconnaissance pour son enthousiasme contagieux envers la recherche et sa grande compréhension humaine lors des périodes plus difficiles. Je remercie également le Dr Michel Demeule pour son dévouement scientifique, sa patience et sa grande disponibilité tout au long de ma maîtrise. Je remercie aussi le Dr Anthony Régina, le Dr Borhane Annabi, Yanick Bertrand, Jonathan Michaud-Lévesque, Anthony Pilorget et le Dr Christian Chai pour leurs aides scientifiques, leur soutien moral et surtout leur gaieté et sens de l'humour inébranlables. Je tiens également à souligner l'excellent travail et soutien expérimental du personnel de recherche, plus particulièrement Julie Poirier, Constance Gagnon et Isabelle Lavallée. J'aimerais aussi témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance aux membres du laboratoire, ce fût très agréable de travailler en votre compagnie durant ces deux dernières années, un remerciement en particulier pour Julie Poirier pour ses précieux conseils. Finalement, mes remerciements sincères envers le département de chimie de l'UQAM, le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) du Canada pour leur soutien financier, entre autres, mais surtout pour la confiance qu'ils ont eu envers mes capacités et mes projets de recherche.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. ÉTAT DES CONNAISSANCES : LA P-GLYCOPROTÉINE	
1.1 Contexte historique de la P-glycoprotéine (P-gp)	3
1.2 Expression et localisation de la P-gp	4
1.3 Le gène MDR et ses isoformes	5
1.4 Structure de la P-gp	6
1.5 Mécanismes de transport des substrats de la P-gp	9
1.6 Substrats de la P-gp	11
1.7 Inhibiteurs de la P-gp	13
1.8 Principaux rôles de la P-gp dans les tissus	15
1.9 Rôles attribués à la P-gp cavéolaire	18
1.10 Phénotype de résistance multiple aux médicaments (MDR)	21
1.11 Agents chimiosensibilisants de la P-gp	23
1.11.1 Les produits naturels: modulation de la P-gp	23
1.11.2 Les furanocoumarins	25
CHAPITRE II. ÉTAT DES CONNAISSANCES : LA P-GP ET LA CAVÉOLINE-1	
2.1 Les microdomaines cavéolaires et les cavéolines	26
2.2 Expression de la cavéoline-1 dans le phénotype d'oncogenèse et de la MDR	28
2.3 Structure de la cavéoline-1	30
2.3.1 SCD ( <i>scaffolding domain</i> ) de la cavéoline-1	31
2.3.2 Signalisation intracellulaire	32

2.4	La cavéoline-1 protéine structurale des cavéoles et son implication dans le transport cavéolaire	33
2.5	Colocalisation cavéolaire de la P-gp : interaction P-gp/cavéoline-1	36
2.6	Relation entre la P-gp et la cavéoline-1 dans la MDR	38
2.7	But de la recherche	39

### CHAPITRE III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1	Matériel	41
3.2	Méthodes	42
3.2.1	Culture cellulaire	42
3.2.2	Transfert de gène et sélection	42
3.2.3	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunodétection	43
3.2.4	Photomarquage de la P-gp avec la dz-CsA (diazirine-cyclosporine A)	45
3.2.5	Immunofluorescence par FACS (cytométrie de flux)	46
3.2.5.1	Immunocytochimie par microscopie à fluorescence	48
3.2.6	Activités de transport de la P-gp par accumulation intracellulaire	49
3.2.6.1	Accumulation intracellulaire de bis-benzimide (Hoechst 33342)	49
3.2.6.2	Accumulation intracellulaire de rhodamine-123 (R-123)	49
3.2.7	Prolifération cellulaire	50
3.2.8	Analyses densitométrique et statistique	50

### CHAPITRE IV. RÉSULTATS

4.1-4.2	Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp chez les cellules MDCK	52
4.3	Augmentation de l'accumulation intracellulaire de R-123 par le cnidiadin chez les cellules MDCK-MDR1	53
4.4	Augmentation de la toxicité cellulaire de la vinblastine par le cnidiadin	54
4.5-4.6	Expression cellulaire des P-gp transfectées transitoirement	55
4.7-4.9	Localisation à la surface cellulaire des P-gp transfectées transitoirement	56
4.10	Activité de liaison supérieure chez les P-gp mutées et transfectées transitoirement	57
4.11-4.12	Sélection clonale, optimisation et expression de la P-gp chez les sélectants	58

4.13	Diminution de l'accumulation intracellulaire chez les mutants de la P-gp	60
4.14	Survie cellulaire accrue à la colchicine chez les mutants de la P-gp	61
4.15	Survie cellulaire accrue à la vinblastine et au Taxol chez les mutants de la P-gp	61
4.16	Augmentation de la résistance multiple chez les mutants de la P-gp	62
CHAPITRE V. DISCUSSION		
5.1	Le cnidiadin un agent chimiosensibilisant potentiel de la P-gp	79
5.1.1	Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp par le cnidiadin	80
5.1.2	Augmentation de l'accumulation intracellulaire de R-123 par le cnidiadin	82
5.1.3	Augmentation de la toxicité cellulaire de la vinblastine par le cnidiadin	82
5.2	Modulation des activités de la P-gp par son niveau d'interaction avec la cavéoline-1	83
5.2.1	Expression et localisation à la surface cellulaire des P-gp humaines transfectées	84
5.2.2	Augmentation de l'activité de liaison et de l'efflux chez les P-gp mutées	85
5.2.3	Augmentation de la survie et de la résistance aux médicaments chez les P-gp mutées	87
CONCLUSION		90
APPENDICE A	Inhibition of P-glycoprotein transport function and reversion of MDR1 multidrug resistance by cnidiadin	92
APPENDICE B	Blood-brain barriers: From ontogeny to artificial interfaces: Part V: Drug delivery to the brain: Chapter 19: The blood-brain barrier: Roles of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein	110
BIBLIOGRAPHIE		145

## LISTE DES FIGURES

Figures	Pages	
1.1	Présentation schématique de la P-gp imbriquée dans la membrane plasmique.	8
1.2	Structure tertiaire de la P-gp.	8
1.3	Mécanismes de transport proposés pour la P-gp.	10
1.4	Fonctions principales de la P-gp dans les tissus.	16-17
1.5	Rôles attribués à la P-gp cavéolaire.	19
2.1	Microscopie électronique des microdomaines cavéolaires.	26
2.2	Changement dans l'expression de la cavéoline-1.	30
2.3	La cavéoline-1 imbriquée dans la membrane plasmique.	31
2.4	Schématisation de la P-gp avec son motif de liaison à la cavéoline-1.	37
3.1	Principe général de la technique du photomarquage de la P-gp à la dz-CsA.	46
4.1	Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp par le cnidiadin chez les cellules MDCK-MDR1.	63
4.2	Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp par les coumarins chez les cellules MDCK-MDR1.	64
4.3	Effet des coumarins sur l'accumulation intracellulaire de R-123.	65
4.4	Effet d'un cotraitement avec le cnidiadin et la vinblastine sur les cellules MDCK-MDR1.	66
4.5	Expression cellulaire des P-gp transfectées transitoirement.	67
4.6	Photomarquage à la dz-CsA des P-gp humaines transfectées transitoirement.	68
4.7	Immunofluorescence directe et indirecte en cytométrie de flux.	69
4.8	Immunocytochimie de la P-gp humaine par microscopie à fluorescence.	70
4.9	Expression à la surface cellulaire des P-gp humaines transfectées transitoirement.	71
4.10	Effet des mutations de la protéine MDR1 sur son activité de liaison au substrat dz-CsA.	72
4.11	Sélection clonale des P-gp humaines transfectées chez les cellules Cos-7.	73
4.12	Expression cellulaire des P-gp transfectées chez les sélectants Cos-7.	74
4.13	Effet des mutations de la P-gp sur l'accumulation intracellulaire de Hoechst.	75
4.14	Effet des mutations de la P-gp sur la survie cellulaire en présence de 25 nM de colchicine.	76

4.15	Effet des mutations de la P-gp sur la survie cellulaire en présence d'agents chimiothérapeutiques.	77
5.1	Structure chimique de six composés naturels de la famille des coumarins.	80
5.2	Présentation de 4 furanocoumarins.	81



## LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Pages
1.1 Isoformes les plus étudiés de la P-gp chez l'humain et les muridés	6
1.2 Substrats de la P-gp	11-12
1.3 Modulateurs de première génération des propriétés de la P-gp	13
1.4 Modulateurs de deuxième génération des propriétés de la P-gp	14
1.5 Modulateurs de troisième génération des propriétés de la P-gp	15
2.1 Diminution de l'interaction P-gp/cavéoline-1 chez les mutants de la P-gp	37
4.16.1 Compilation des IC <sub>50</sub>	78

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP binding cassette</i> (cassette liant l'ATP)
ACAT	Acyl-CoA cholestérol acyltransférase
ARNi	Acide ribonucléique interférant ( <i>ARNsi</i> )
ARNm	Messenger d'acide ribonucléique
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BBCEC	Cellules endothéliales de capillaires de cerveau bovin
BCRP	Protéine de résistance du cancer du sein
BCS	Sérum de veau bovin ( <i>bovine calf serum</i> )
BSA	Albumine de sérum bovin
BSC	Barrière sang-cerveau
Cav-1	Cavéoline-1
Cav-2	Cavéoline-2
Cav-3	Cavéoline-3
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (régulateur transmembranaire de la mucoviscidose)
COS-7	Cellule rénale de singe vert d'Afrique
COX-2	Cyclooxygénase-2
CsA	Cyclosporine A
DIC	Domaine d'inhibition de la cavéoline
DIGs	Domaine insoluble enrichi en glycosphingolipides
DMEM-hg	<i>Dubelco's Modified Eagle Medium with high glucose</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Domaine d'oligomérisation
DT	Domaine terminal
DTM	Domaine transmembranaire
Dz-CsA	Diazirine cyclosporine A
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGCG	Épigallocatecine gallate

EGF-R	Récepteur du facteur de croissance épithélial
eNOS	Oxide nitrique synthétase endothéliale
ERK	Kinase régulée par signal extracellulaire ( <i>Extracellular-signal regulated protein kinase</i> )
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Sérum de veau fœtal ( <i>fœtal bovin serum</i> )
GFP	Protéine verte fluorescente ( <i>Green fluorescent protein</i> )
Glut-4	Transporteur de glucose-4
GPI	Glycosylphosphatidyl inositol
GRB2	Protéine 2 liée au récepteur des facteurs de croissance ( <i>growth factor receptor-bound protein 2</i> )
GTPases	Protéine liant le guanosine 5'-triphosphate
G-418	Généticine (antibiotique de sélection)
HBSS	<i>Hank's balance Salt solution</i>
HDL	Lipoprotéine de haute densité ( <i>High density lipoproteins</i> )
HIF-1 $\alpha$	Facteur inductible d'hypoxie ( <i>hypoxia-inducible factor-1</i> )
HIF-1 $\beta$	Facteur inductible d'hypoxie ( <i>hypoxia-inducible factor-1</i> )
HIV	Virus de l'immunodéficience acquise humaine
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
HSE	Élément de choc thermique ( <i>Heat shock element</i> )
HSP	Protéine de choc thermique ( <i>heat shock protein</i> )
IgG	Immunoglobuline de type G
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotéine de basse densité ( <i>Low density lipoproteins</i> )
LRP	Protéine de résistance pulmonaire ( <i>Lung resistance protein</i> )
MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes
MDCK	Cellules canines rénales Madin-Darby
MDR	Résistance multiple aux médicaments ( <i>multidrug resistance</i> )
MDR1	Gène codant pour la P-gp humaine de classe 1
MRP1	<i>Multidrug resistance associated protein 1</i>
NBFs	Site nucléotidique de liaison ( <i>nucleotide binding folds</i> )
NF-Y	Facteur nucléaire Y

NK	<i>Natural killer</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive fusion protein</i>
PBS	Solution saline de phosphate
PDGF-R	Récepteur des facteurs de croissance dérivés des plaquettes ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
P-gp	P-glycoprotéine
Phe	Phénylalanine
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PVDF	<i>PolyVinylidene DiFluoride</i>
R-123	Rhodamine-123
SCD	Domaine d'échafaudage ( <i>Scaffolding domain of caveolin-1</i> )
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SM	Sphingomyéline
SNAP	<i>Soluble NSF attachment proteins</i>
SNC	Système nerveux central
SNPs	<i>Single Nucleotide polymorphisms</i>
SOS	<i>Son-of-sevenless</i>
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
SREs	<i>Sterol regulatory elements</i>
SV40	Virus simiens 40
TBS	Tris balance solution
Trp	Tryptophane
sTM	Segments transmembranaires
Tyr	Tyrosine
UV	Ultraviolet
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
VEGF-R	Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire

## RÉSUMÉ

La P-glycoprotéine est une protéine transmembranaire qui agit comme une pompe à efflux et expulse activement hors de la cellule une grande variété de molécules hydrophobes, c'est à dire la majorité des médicaments. De par sa fonction de transport des médicaments et de ses localisations anatomiques stratégiques, la P-glycoprotéine est en partie responsable des échecs aux traitements chimiothérapeutiques, limite la biodisponibilité des médicaments tout en favorisant une résistance multiple à différents types de médicaments.

Le premier volet de cette étude fût d'évaluer les capacités inhibitrices des activités de la P-glycoprotéine par six composés végétaux de la famille des coumarins. Seul le cnidiadin inhibe l'activité de transport de la P-glycoprotéine en augmentant l'accumulation intracellulaire des substrats de la P-glycoprotéine et en diminuant synergiquement la survie cellulaire en présence de vinblastine. De plus, le cnidiadin, semble pouvoir modifier la biodisponibilité des substrats de la P-glycoprotéine en inhibant compétitivement la liaison du substrat diazirine-cyclosporine A. Ces résultats suggèrent qu'une diète contenant du cnidiadin pourrait soit renverser le phénotype de résistance multiple aux médicaments, soit moduler la biodisponibilité des substrats de la P-glycoprotéine, en tant qu'agent chimiosensibilisant.

Autres que les agents chimiosensibilisants, nous avons aussi exploré l'impact du niveau d'interaction entre la P-glycoprotéine et la protéine structurale des cavéoles, la cavéoline-1, sur les activités associées à la P-glycoprotéine. Pour ce faire, des mutants de la P-glycoprotéine humaine à son motif de liaison à la cavéoline-1 furent utilisés. Nous avons montré antérieurement que l'interaction entre la cavéoline-1 et les P-glycoprotéines mutantes à leur motif de liaison à la cavéoline-1 est réduite d'environ 40%. Nous avons donc approfondi l'étude et lors d'essais d'activités de liaison et de transport de substrat des P-glycoprotéines mutantes, nous avons mesuré une augmentation de ces activités ainsi qu'une résistance cellulaire significativement supérieure. En conséquence, la cavéoline-1 semble contrôler négativement les activités de liaison et de transport de la P-glycoprotéine. Une variation de l'interaction entre la P-glycoprotéine et la cavéoline-1 pourrait être un mécanisme utilisé par la cellule pour contrôler ce transporteur cellulaire et lors d'exposition à différents agents cytotoxiques, ce même mécanisme pourrait être impliqué dans le développement de la résistance multiple aux médicaments.

En résumé, les principales contributions de cette étude sur la P-glycoprotéine sont 1) inhibition des activités de la P-glycoprotéine par le cnidiadin, particulièrement son activité de liaison au substrat 2) régulation négative des activités de liaison et de transport de la P-glycoprotéine par la cavéoline-1 et 3) augmentation de la résistance cellulaire suite à une diminution du niveau d'interaction entre la P-glycoprotéine et la cavéoline-1.

Mots clés : P-glycoprotéine, résistance multiple aux médicaments, agents réversants naturels, interaction P-glycoprotéine/cavéoline-1, liaison et transport des substrats

## INTRODUCTION

La P-glycoprotéine (P-gp), un produit du gène humain MDR1, est largement impliquée dans la résistance multiple et la biodisponibilité des médicaments dans l'organisme (Dean, Hamon et Chimini, 2001; Borst et Elferink, 2002). De par sa localisation stratégique et son activité de transport des médicaments, la P-gp, permet de maintenir une concentration intracellulaire sous un niveau cytotoxique et/ou thérapeutique induisant donc une résistance à la thérapie (Juliano et Ling, 1976; Gros *et al.*, 1986; Ueda *et al.*, 1986). Plusieurs études ont démontré que la résistance multiple aux médicaments (MDR) est un processus multifactoriel impliquant principalement une surexpression de la P-gp et une augmentation de la surface et de la densité cavéolaire des cellules exposées aux différents agents thérapeutiques (Bosch et Croop, 1996; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998 et 2001; Yang *et al.*, 1998). La MDR est donc un processus qui fait interagir différentes molécules qui auront leur apport spécifique au développement, progression ou maintien de la MDR et les principaux intervenants ou modulateurs de cet état cellulaire sont la P-gp, les cavéoles et leurs constituants. L'objectif de cette étude est d'évaluer les capacités d'inhibition des activités de liaison et de transport des substrats de la P-gp, conséquemment la résistance multiple aux médicaments, par différentes molécules : 1) au niveau de molécules naturelles pouvant être présentes dans la diète quotidienne et 2) au niveau de molécules endogènes retrouvées dans le microenvironnement de la P-gp.

De prime abord, six molécules naturelles de la famille des coumarins : l'umbelliférone, l'esculin, l'esculetin, le cnidiadin, l'angelicin et le psoralen ont été évalué *in vitro* pour leur action possible en tant qu'agent naturel à action chimiosensibilisante envers la P-gp. Dans le deuxième volet, nous avons poursuivi l'étude du niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1, particulièrement son impact sur l'activité de liaison du substrat à la P-gp et la résistance cellulaire. Pour ces deux volets de recherche sur l'étude de la P-gp, l'activité de transport de cette dernière est évaluée par accumulation intracellulaire de substrats fluorescents et/ou radioactifs, la résistance des cellules évaluée par prolifération cellulaire en présence d'un agent chimiothérapeutique et l'activité de liaison de la P-gp au substrat par photomarquage de la P-gp à la diazirine cyclosporine A (dz-CsA), voir chapitre III pour le matériel et méthodes utilisés.

Ce mémoire de recherche est divisé en deux parties majeures, la première comprend l'état des connaissances sur la P-gp, les cavéoles, la cavéoline-1 et le lien entre la P-gp et la cavéoline-1, suivie de la présentation du matériel et méthodes utilisés. La seconde partie de ce mémoire sont les résultats obtenus et discutés.

Il est à noter que les résultats présentés aux figures 4.1 à 4.4 du présent mémoire ont contribué à la publication, en tant que co-auteur, en avril 2005 de l'article de revue « Inhibition of P-glycoprotein transport function and reversion of MDR1 multidrug resistance by cnidiadin » (annexe : appendice A). De plus, j'ai été invité à écrire une section présentant une synthèse des différents résultats de recherche sur les polymorphismes du gène MDR1 et leur impact sur l'expression et les fonctions de la P-gp au niveau de la barrière sang-cerveau (BSC). Cette section (19.4 : Polymorphisms of P-gp) fait partie d'un article scientifique « The blood-brain barrier : Roles of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein » synthétisant les différents rôles de la P-gp au niveau de la BSC. L'article représente le chapitre 19 de la partie V « Drug delivery to the brain » du livre « Blood-Brain Barrier : From ontogeny to artificial interfaces ». Cet article est mis en annexe à l'appendice B et ne sera pas discuter dans ce mémoire.

## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES : LA P-GLYCOPROTÉINE

#### 1.1 Contexte historique de la P-glycoprotéine

La P-gp est une pompe transmembranaire à efflux de la grande famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*), largement impliquée dans la résistance multiple. La grande majorité des protéines ABC sont des transporteurs actifs qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) comme force motrice pour transporter les substrats contre un gradient de concentration à travers les membranes cellulaires. Ces protéines sont classées en tant que transporteurs ABC due à la séquence et à l'organisation de leur domaine de liaison à l'ATP, aussi connu en tant que site de liaison nucléotidique (nucleotide binding folds, NBFs). Cette super famille de transporteurs ABC est divisée en 7 familles de A à G où plus de 48 membres de la super famille ABC furent retrouvés chez l'humain (Dean, Hamon et Chimini, 2001; Borst et Elferink, 2002).

La P-gp (transporteur ABCB1), fut initialement découverte durant les années 1970 dans le domaine de la recherche sur le cancer, particulièrement sur la résistance multiple aux médicaments, appelée la MDR (Biedler et Riehm, 1970; Ling et Thompson, 1974). Ils observèrent que suite à une exposition à un agent anti-cancéreux, les cellules développaient une résistance à l'agent utilisé ainsi qu'à plusieurs autres agents de structures et de fonctions complètement différentes (Biedler et Riehm, 1970; Dano, 1973). Leurs observations ont démontré une plus faible accumulation intracellulaire de l'agent utilisé dans les cellules exposées suggérant soit une diminution de l'influx de l'agent vers l'intérieur de la cellule, soit une augmentation de l'efflux de l'agent vers l'extérieur de la cellule. En 1976, Juliano et Ling découvrirent, chez les cellules ovariennes de hamster chinois exposées à la colchicine, une plus grande expression d'une protéine glycosylée de poids moléculaire de 170 000 daltons. Ils observèrent que l'expression de cette glycoprotéine, qu'ils nommèrent P-glycoprotéine (où le P réfère à la perméabilité), était responsable de la résistance des cellules tumorales envers de grandes variétés d'agents chimiothérapeutiques (Juliano et Ling, 1976).



Différentes études ultérieures démontrèrent que la P-gp, du gène MDR humain ou de souris, transfectée dans différentes cellules, ces dernières devenaient résistantes, confirmant de ce fait que la P-gp joue un rôle important dans l'acquisition du phénotype MDR (Gros *et al.*, 1986; Ueda *et al.*, 1986).

## 1.2 Expression et localisation de la P-gp

L'expression de la P-gp fut premièrement associée aux cellules tumorales et cancéreuses exprimant le phénotype de la résistance multiple aux médicaments. Chez les tumeurs cérébrales de type astrocytaire, l'expression de cette glycoprotéine est maintenue mais elle est augmentée dans les méningiomes par rapport à un cerveau sain (Demeule *et al.*, 2001b). La P-gp fut aussi détectée chez les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins présents dans les tumeurs cérébrales. Sa présence suggère que la faible réponse obtenue de ces tumeurs aux traitements chimiothérapeutiques est reliée à l'expression de la P-gp au niveau des cellules tumorales, mais également à l'expression de la P-gp au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral (Toth *et al.*, 1996; Régina *et al.*, 2003).

Par contre, différentes études au cours des vingt dernières années, démontrèrent que la P-gp est normalement exprimée au niveau des barrières sang-tissus telles que la barrière sang-cerveau, la barrière sang-testicules et le placenta, tout comme elle fut retrouvée chez plusieurs tissus normaux ayant des fonctions excrétoires, tels que le foie, les reins, le petit intestin et les glandes surrénales (Fojo *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1990; Jetté, Têtu et Béliveau, 1993). On la retrouve aussi au niveau du cœur, des muscles, de la rate, de l'estomac, chez les lymphocytes T et B, chez les cellules souches hématopoïétiques, les cellules NK (*natural killer*), les capillaires du cortex cérébral, les poumons ainsi que chez l'embryon en développement (Fojo *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1990; van der Valk *et al.*, 1990; van Kalken *et al.*, 1992; Chong *et al.*, 1993; Jetté, Têtu et Béliveau, 1993; Klimecki *et al.*, 1994; Demeule *et al.*, 1999).

De plus, plusieurs groupes ont démontré que l'expression de la P-gp au niveau des capillaires du cortex cérébral est localisée à la surface luminale de l'endothélium vasculaire du cerveau sain, ce qui assure la protection de ce dernier en prévenant le passage de plusieurs

composés toxiques vers le cerveau (Beaulieu *et al.*, 1997; Régina *et al.*, 2001; Schinkel, 1999; Sugawara *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 1996; Virgintino *et al.*, 2002a). Récemment, en plus de sa localisation à la surface luminale des cellules endothéliales, elle fut retrouvée, chez plusieurs types de cellules MDR, au niveau membranaire dans des microdomaines spécialisés de la membrane plasmique, les cavéoles, riches en cholestérol et en cavéoline-1 (Demeule *et al.*, 2000b, Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998). La P-gp cavéolaire fait actuellement l'objet d'études visant à mieux comprendre l'importance de cette localisation subcellulaire pour ses fonctions de transport et d'élimination des médicaments (voir section 1.8 pour les principaux rôles de la P-gp dans les tissus et section 1.9 pour les rôles attribués à la P-gp dans le transport cavéolaire).

Cependant, l'expression du gène MDR1 est affectée par différents stress, tels que les agents cytotoxiques, le choc thermique, l'irradiation, l'hypoxie, des cytokines et des facteurs de croissance (Sukhai et Piquette-miller, 2000). De plus, plusieurs facteurs de transcription lient des séquences en amont des gènes MDR et modulent leur expression. Par exemple, l'irradiation par des rayons UV amène le facteur nucléaire Y de transcription (NF-Y) à lier la boîte inversée CCAAT, ce qui stimule l'expression transcriptionnelle du gène MDR1 (Jin et Scotto, 1998). Un deuxième exemple, serait en condition d'hypoxie où l'expression du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1*) augmente, permettant ainsi la dimérisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  pour former un facteur de transcription fonctionnel nécessaire à l'augmentation de l'expression de la P-gp (Comerford *et al.*, 2002; Wartenberg *et al.*, 2003). D'autre part, la P-gp agit comme une protéine de choc thermique (HSP) lorsqu'il y a exposition à des températures élevées. Son expression est augmentée due à la présence de deux motifs consensus HSE (heat shock element) au niveau de la séquence promotrice du gène MDR1 (Sukhai et Piquette-Miller, 2000).

### 1.3 Le gène MDR et ses isoformes

La P-gp est le produit des gènes MDR que l'on retrouve chez la majorité des espèces où les plus étudiées sont l'être humain, la souris, le rat et le hamster (Chen *et al.*, 1986; Gros, Croop et Housman, 1986; Devault et Gros, 1990; Gros *et al.*, 1988; Roninson *et al.*, 1986;

Ueda *et al.*, 1987). On retrouve chez l'humain deux gènes MDR, *MDR1* et *MDR2*, sur le bras long du chromosome 7 encodant pour les isoformes MDR1 et MDR2 (Callen *et al.*, 1987; Chin *et al.*, 1989) et trois gènes MDR chez les rongeurs encodant pour les isoformes, *mdr 1*, *mdr 2* et *mdr 3*. Par contre, chez d'autres mammifères, tels que le cochon et le chien, plus de trois gènes MDR furent identifiés. Tout comme chez plusieurs gènes ayant une importance fonctionnelle pour l'organisme, les gènes MDR possèdent un haut degré d'identité entre les isoformes de la même espèce et entre les isoformes inter-espèces. En effet, plus de 76% d'identité ont été observé entre les gènes humains *MDR1* et *MDR2* et 88% d'identité entre le gène *mdr 3* de la souris et le gène *MDR2* de l'humain (Gottesman et Pastan, 1993). Chez les espèces les plus étudiées, voir tableau 1.1, les gènes MDR sont regroupés en trois classes distinctes : les isoformes de la classe I et II, qui sont impliqués dans la résistance multiple aux médicaments et les isoformes de la classe III qui sont plutôt impliqués dans le transport de la phosphatidylcholine à travers la membrane caniculaire des hépatocytes (Jetté *et al.*, 1995; Bendayan *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 1993 ; Ruetz et Gros, 1994).

Tableau 1.1 Isoformes les plus étudiés de la P-gp chez l'humain et les muridés

Espèces	Résistance multiple		Transport phosphatidylcholine
	Classe I	Classe II	Classe III
Humain	MDR1	--	MDR2
Rat et souris	mdr 1a (mdr 3)	mdr 1b (mdr 1)	mdr 2
Hamster	pgp 1	pgp 2	pgp 3

(Modifié d'après Bendayan *et al.*, 2002)

#### 1.4 Structure de la P-gp

La P-gp humaine, produit du gène *MDR1*, est constituée de 28 exons ayant un total de 1280 acides aminés. La connaissance de la séquence totale en acides aminés de la P-gp a permis de prédire une topologie majoritairement admise de cette dernière. Dans ce modèle où

la figure 1.1 représente un schéma de sa structure secondaire, la glycoprotéine est composée de deux sous-unités ayant 43% d'homologie de séquence, suggérant une duplication du gène ancestral (Chen *et al.*, 1986 ; Raymond et Gros, 1989). Chacune de ces deux sous-unités contient un domaine transmembranaire (DTM) constitué de six segments en hélices  $\alpha$  qui traversent de part et d'autre la membrane plasmique (sTM) : DTM1 ; segments TM de 1 à 6 et DTM2 ; segments TM de 7 à 12. De plus, chacune des sous-unités possède un domaine cytoplasmique, le domaine de liaison nucléotidique (NBFs), composé d'une séquence consensus de liaison à l'ATP (Chen *et al.*, 1986; Gottesman et Pastan, 1993). Ces deux sous-unités de la P-gp sont reliées entre elles par une jonction, la région charnière, porteuse de sites de phosphorylation aux sérines 661, 667, 671, 675, 683 (Gottesman *et al.*, 1995). Par contre, seule la sous-unité de la portion N-terminale de la P-gp, sur la première boucle extracellulaire, possède de deux à quatre sites de glycosylation responsables de la variation tissulaire et inter-espèce du poids moléculaire de la P-gp, de 150 à 180 kDa, dont 170 kDa pour celle d'origine humaine (Devault et Gros, 1990; Gottesman *et al.*, 1995; Higgins *et al.*, 1997).

La structure tertiaire proposée pour la P-gp, fig. 1.2, est le résultat de l'association des douze segments transmembranaires et du repliement de la protéine sur elle-même formant, ainsi, une sorte de tunnel conique qui traverse la membrane plasmique (Rosenberg *et al.*, 1997). C'est à dire que cette structure en cône est constituée d'une ouverture élargie du côté cytoplasmique d'environ 10 nm de diamètre où le centre du pore est de 5 nm et tend à se fermer du côté cytoplasmique de la membrane, formant ainsi une chambre intérieure membranaire de forme conique. Il est à noter, que la chambre intérieure membranaire est aussi nommée poche de liaison des médicaments (*drug-binding pocket*). Le domaine de liaison de l'ATP de la protéine tend à former du côté intracellulaire une sorte de chambre semi-fermée (Rosenberg *et al.*, 1997). De plus, dans certains compartiments tissulaires et dans les cellules MDR, différents niveaux d'oligomérisation furent observés. Ces monomères et oligomères démontrèrent qu'ils étaient fonctionnels, ils peuvent lier leurs substrats et l'ATP, ainsi qu'être phosphorylés (Boscoboinik *et al.*, 1990 ; Jetté *et al.*, 1997).

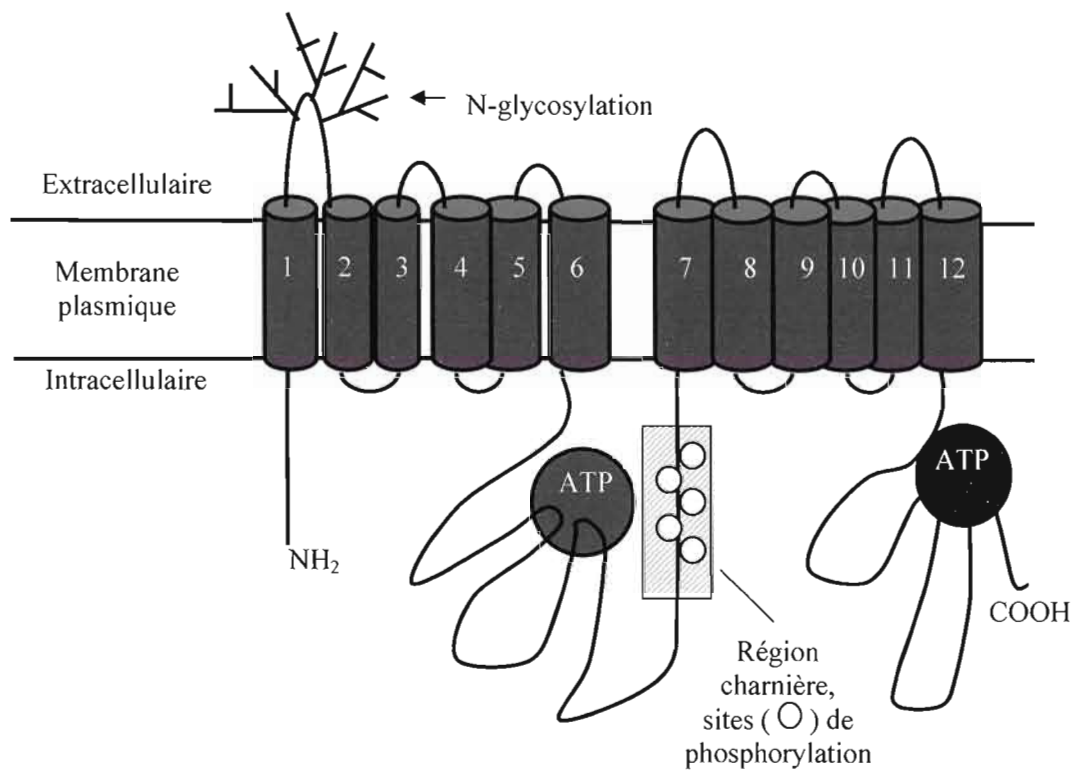


Figure 1.1 : Présentation schématique de la P-gp imbriquée dans la membrane plasmique. Le schéma représente la topologie prédite de la P-gp avec ses deux domaines transmembranaires (DTM) constitués des segments transmembranaires (sTM) 1 à 6 et 7 à 12 respectivement, ses deux sites de liaison à l'ATP, le site de N-glycosylation et la région charnière contenant des sites de phosphorylation. (modifié d'après Bendayan *et al.*, 2002)

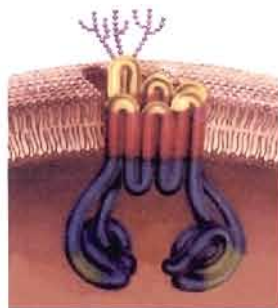


Fig. 1.2 : Structure tertiaire de la P-gp. Schéma représentant l'association des domaines transmembranaires ainsi que le repliement de la protéine pour former une chambre conique (poche de liaison aux médicaments) qui traverse la bicouche lipidique de la membrane plasmique. (Rosenberg *et al.*, 1997)

### 1.5 Mécanismes de transport des substrats de la P-gp

Trois mécanismes de transport des substrats ont été proposés pour la P-gp; le modèle classique, le modèle de la flippase et le modèle de la pompe à efflux (*Hydrophobic vacuole cleaner*). Premièrement, chez le modèle classique, fig. 1.3 a, le substrat se retrouve du côté cytosolique et est par la suite transporté vers l'extérieur de la cellule. Par contre, il a été démontré que les substrats de la P-gp, qui sont majoritairement hydrophobes, pénètrent dans la cellule soit par diffusion passive, soit en se partitionnant dans la bicouche lipidique de la membrane (Beck, 1990). Une fois à l'intérieur de la bicouche lipidique, les substrats seront captés au niveau des domaines transmembranaires de la P-gp et ultérieurement expulsés hors de la cellule (Beck, 1990). Dans le modèle de la flippase, fig. 1.3 b, suite à leur captation au niveau du feuillet interne de la membrane, les substrats sont activement transportés vers le feuillet externe de la membrane où la molécule pourra diffuser vers l'extérieur de la cellule (Higgins et Gottesman, 1992). Tandis que dans le modèle de la pompe à efflux, fig. 1.3 c, le substrat est capté et expulsé activement hors de la cellule avant qu'il n'ait atteint le compartiment intracellulaire (Gottesman et Pastan, 1993).

Les modèles les plus retenus de nos jours sont celui de la flippase mais plus particulièrement celui de la pompe à efflux avec sa chambre membranaire (poche de liaison aux médicaments) où l'eau pourrait jouer un rôle dans le cycle de transport des médicaments (Loo, Bartlett et Clarke, 2004). Cette dernière étude suggère la présence d'un pore aqueux à l'intérieur de la P-gp. C'est à dire, selon le modèle de la pompe à efflux (Gottesman et Pastan, 1993), lors de la diffusion et/ou du partitionnement des médicaments dans la double couche lipidique (Beck, 1990), ceux-ci sont déhydratés et captés par la P-gp, selon un mécanisme encore inconnu, à l'intérieur de la poche de liaison des médicaments (Loo, Bartlett et Clarke, 2004). Une fois à l'intérieur, le substrat est réhydraté, induisant soit un réarrangement des sTM, soit une hydrolyse de l'ATP. Par contre, l'étude de Loo, Bartlett et Clarke, 2004 montre qu'une réhydratation complète du substrat nécessite l'hydrolyse de l'ATP. Conséquemment, l'hydrolyse de l'ATP induit un changement conformationnel de la P-gp qui est principalement la rotation des hélices  $\alpha$  et l'exposition de différents résidus des domaines transmembranaires à l'intérieur de la poche de liaison aux médicaments (Loo, Bartlett et Clarke, 2004; Rosenberg *et al.*, 2003). Ce changement de structure de la chambre

interne du transporteur induit un état chez la P-gp de haute affinité à un état de faible affinité envers le substrat résultant à l'expulsion de ce dernier vers le feuillet externe et le milieu extracellulaire. Ce sont les résidus exposés à l'intérieur de la chambre de la P-gp qui permettent l'interaction et la liaison d'une grande variété de substrats de la P-gp où des études en fluorescence et en photomarquage viennent supporter l'existence de différents sites de liaison des substrats pour la P-gp (Tang *et al.*, 2004; Shapiro, Corder et Ling, 1997). Par contre, l'hydratation des substrats au niveau de la poche de liaison aux médicaments semble empêcher les substrats de diffuser à nouveau dans la bicouche lipidique. De plus, cette étape d'hydratation suggère aussi que le substrat est préparé pour un transport subséquent dans le milieu aqueux extracellulaire. En conséquence, l'hydratation des médicaments dans la poche de liaison des substrats permettrait d'expliquer le transport par la P-gp de différentes molécules hydrophobes dans le milieu aqueux extracellulaire (Loo, Bartlett et Clarke, 2004).

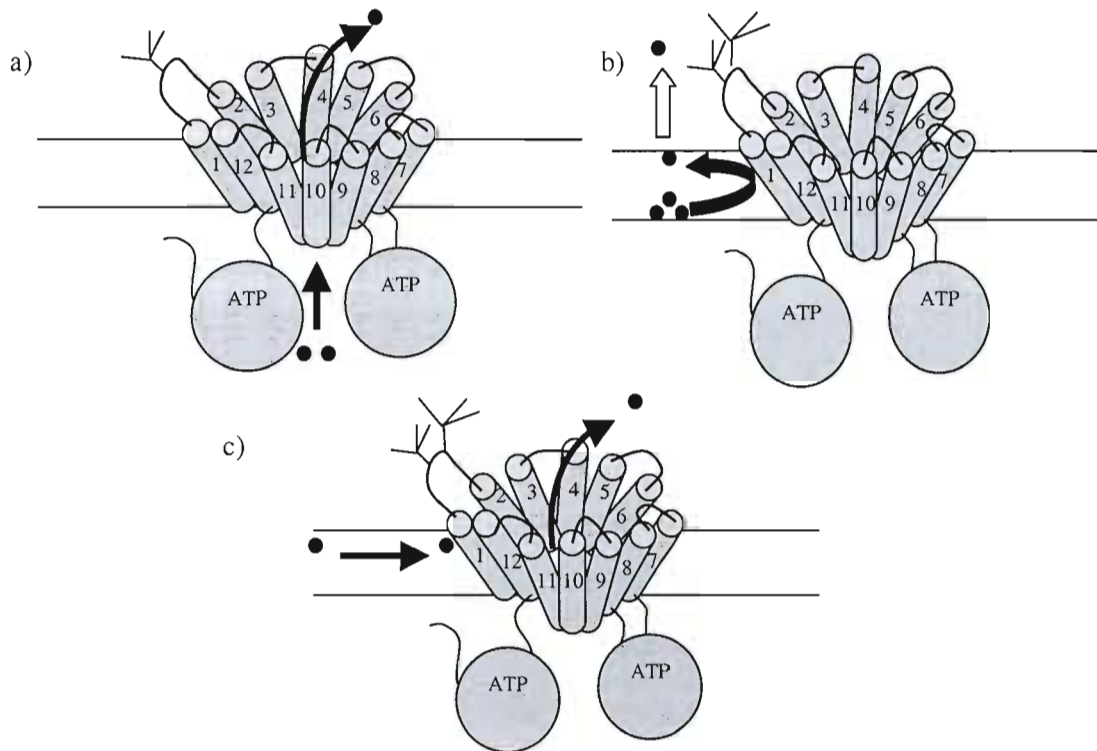


Fig. 1.3 : Mécanismes de transport proposés pour la P-gp. a) Le modèle classique, b) le modèle de la flippase et le modèle de la pompe à efflux en c). (Modifiée d'après Loo, Bartlett et Clarke, 2003)

## 1.6 Substrats de la P-gp

Les substrats de la P-gp sont présents en grand nombre et possèdent des structures et des fonctions très variées. La majorité des substrats connue à ce jour sont des molécules d'origine naturelle qui pénètrent à l'intérieur de la cellule par diffusion passive ou en se partitionnant dans la bicouche lipidique (Beck, 1990; Gupta, Murray et Gupta, 1988). En effet, les substrats de la P-gp sont des molécules amphipatiques ayant des propriétés leur permettant de s'insérer de façon appropriée dans la bicouche lipidique. Cependant, il existe peu de dénominateurs structuraux communs chez les substrats transportés par la P-gp, en général ce sont des molécules organiques de 200 à 1900 Da. Les molécules les mieux transportées sont faiblement ou non chargées et souvent elles possèdent des groupes aromatiques mais peuvent être aussi non aromatiques, linéaires ou circulaires. La P-gp possède deux sites principaux de liaison pour ses substrats sur chacun de ses deux DTM, au niveau des sTM 5 et 6 et des sTM 11 et 12 (Dey *et al.*, 1997). Le tableau 1.2 résume les différentes classes de substrats de la P-gp, mais ce dernier est non exhaustif (Fromm, 2002; Schinkel et Jonker, 2003; Karssen *et al.*, 2001; Uhr *et al.*, 2002; Kawaguchi *et al.*, 2004; Akazawa *et al.*, 2002; Bonhomme *et al.*, 2002; Oude et Zadina, 2001; Uchiyama *et al.*, 2004).

Tableau 1.2 Substrats de la P-gp

<i>Hormones/stéroïdes</i>	<i>Peptides toxiques</i>	<i>Peptides bioactifs</i>
Hydrocortisone	Valinomycine	Adrenorphin
Testostérone	Gramicidine D	Endomorphine 1 et 2
Dexaméthasone	<i>Cytokines</i>	Somatostatine
Estradiol	Interleukines-1 $\beta$ , 2 et 4	Substance P
Progestérone	Interferon- $\gamma$	$\beta$ -amyloïde

(modifié d'après Turcotte *et al.*, 2006; appendice B)



Suite Tableau 1.2	Substrats de la P-gp	
<i>Agents anticancéreux</i>	<i>Antihistaminiques</i>	<i>Autres composés</i>
Vinblastine	Fexofenadine	Opioides (morphine)
Vincristine	Terfenadine	Acide acadaïque
Actinomycine D	Cimetidine	Lovastatin
Étoposide	Ranitidine	Aldostérone
Doxorubicine	<i>Immunosuppresseurs</i>	Cortisol
Daunorubicine	Cyclosporine A	Corticostérone
Paclitaxel	Tacrolimus	Glucocorticoïdes
Docetaxel	FK506	Sphingomyéline
Irinotecan	Rapamycine	Rifampine
Topotecan	Diazirine-CsA	Tamoxifene
Colchicine	Sirolimus	tPA
Dexamethasone	<i>Antibiotiques</i>	Cholestérol
Mitomycine	Érythromycine	<i>Médication cardiovasculaire</i>
Tamoxifen	Levofloxacin	Digoxine
<i>Colorants fluorescents</i>	Sparflocacin	Digitoxine
Rhodamine 123	<i>Antifongiques</i>	Quinidine
Hoechst 33342	Itraconazole	β-acétyldigoxine
Calcéine-AM	Ketacopnazole	α-méthyldigoxine
Tétracycline	<i>Antiémétiques</i>	<i>Inhibiteurs canaux calciques</i>
t-phénylphosphonium	Domperidon	Vérapamil
Ramosetron	Ondansetron	Felodipine
<i>Antiépileptiques</i>	<i>Inhibiteurs des protéases HIV</i>	Diltiazem
Phénobarbital	Amprenavir	Nicarpédine
Lamotrigine	Indinavir	Mibefradil
Felbamate	Nelfinavir	<i>Détergents</i>
	Saquinavir et Ritonavir	Triton X-100
(modifié d'après Turcotte <i>et al.</i> , 2006; appendice B)		Tween 80

### 1.7 Inhibiteurs de la P-gp

Les composés d'intérêts dans cette classe sont principalement les molécules pouvant inhiber l'activité de transport de cette glycoprotéine. Les agents réversants sont des molécules qui, en inhibant l'activité de transport de la P-gp, changent l'état des cellules résistantes en cellules sensibles. Trois générations de ces composés sont connues, la première génération d'inhibiteurs de la P-gp développée durant les années 1980-1990 comprenait des bloqueurs des canaux calciques (vérapamil), des antagonistes de la calmoduline, des stéroïdes, des quinolines, des antibiotiques, des détergents et des agents immunosuppresseurs (Ford et Hait, 1990; Lum *et al.*, 1993; Rederer et Scheithauer, 1993). Cependant, ces composés sont cytotoxiques pour les tissus sains lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations permettant l'inhibition des activités de transport de la P-gp. De plus, la majorité de ces composés sont des substrats autant pour la P-gp que pour plusieurs autres transporteurs. Parmi eux, la cyclosporine A (CsA) et la vérapamil sont les plus étudiés mais ne peuvent être utilisés sécuritairement comme agents réversants cliniques. Donc, une seconde génération de modulateurs des activités de la P-gp a été développée dans le but de diminuer les effets secondaires rencontrés avec la première génération et d'augmenter aussi l'efficacité de l'inhibition.

Table 1.3 Modulateurs de première génération des propriétés de la P-gp

<i>Première génération</i>	<i>Utilisation médicale</i>
Cyclosporine A	Immunosuppresseur
Nifedipine	Bloqueur de canaux calciques
Progestérone	Progestatif
Quinidine	Antiarythmique
Quinine	Antimalaria
Tamoxifen	Antioestrogène
Vérapamil	Bloqueur de canaux calciques

(modifié d'après Turcotte *et al.*, 2006; appendice B)

Les composés de la deuxième génération ont les mêmes propriétés pharmacologiques des molécules d'origine et démontrent une toxicité réduite. Malgré une meilleure efficacité leur utilisation clinique est assez limitée. En effet, ces médicaments inhibent significativement le métabolisme et l'excrétion de différents agents cytotoxiques car ils influencent les activités d'enzymes de détoxification et d'autres transporteurs, tels que le cytochrome P450 3A4 et la MRP1 (Thomas et Coley, 2003; Wandel *et al.*, 1999; Rowinsky *et al.*, 1998). Lors des essais cliniques, à cause de cette inhibition métabolique et excrétoire des agents cytotoxiques utilisés, ces agents de seconde génération ont induit une haute toxicité et ceci même en diminuant les concentrations chimiothérapeutiques. De plus, ces composés entrent en compétition pour leur transport par la P-gp avec les agents cytotoxiques utilisés ce qui amène des interactions pharmacocinétiques imprévues. En conséquence, ces composés ne sont pas spécifiques envers la P-gp, leur effet est de courte durée et des interactions pharmacocinétiques diminuent leur élimination et augmentent leur toxicité dans les tissus sains. Donc, après plusieurs résultats cliniques décourageant, une troisième génération d'inhibiteurs plus puissants et surtout plus spécifiques envers la P-gp a été développée.

Tableau 1.4 Modulateurs de deuxième génération des propriétés de la P-gp

<i>Deuxième génération</i>	<i>Analogie à</i>
Valspodar (PSC833)	Cyclosporine A
Cinchonine	Quinine
Dexniguldipine	Nifedipine
Dexvérapamil	Vérapamil

(modifié d'après Turcotte *et al.*, 2006; appendice B)

Cette troisième génération de composés a été développée en utilisant la chimie combinatoire et la relation structure-activité que peuvent avoir certains membres d'une famille de composés structuraux (Thomas et Coley, 2003; Goldman, 2003). Cette génération de composés n'affecte pas les activités du cytochrome P450 3A4, cible plus spécifiquement les fonctions de la P-gp et parce qu'ils sont des inhibiteurs non compétitifs de la P-gp il a été

possible de réduire le dosage des agents chimiothérapeutiques utilisés. Par contre, l'efficacité clinique de ces composés en tant qu'agents réversants reste à être confirmée malgré les résultats préliminaires encourageants.

Tableau 1.5 Modulateurs de troisième génération des propriétés de la P-gp

<i>Troisième génération</i>	<i>Structure chimique</i>
Tariquidar (XR9576)	Anthranilamide
Zosuquidar (LY335979)	Difluorocyclopropyldibenzosuberane
ONT-093	Diatylimidazole substitué
Biricodar (VX710)	Carboxylate de piperidine
Elacridar (GF120918/GG918)	Carboxamide d'acridone

(modifié d'après Turcotte *et al.*, 2006; appendice B)

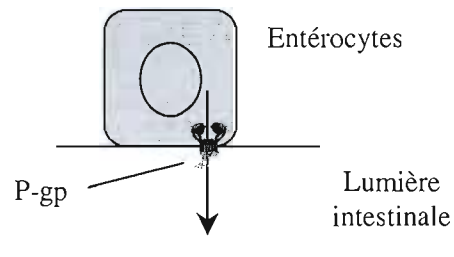
Autres que les agents réversants ou chimosensibilisants, d'autres approches ont été développées pour réduire ou inhiber non pas l'activité de transport mais plutôt l'expression de la P-gp. Ces approches ont été l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la P-gp, les immunotoxines, les oligonucléotides antisens et les petits ARN interférants (ARNi) (Xu *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2004). De plus, certains composés naturels présents dans la diète quotidienne peuvent soit inhiber la P-gp, soit moduler ses activités, la section 1.11 élaborera sur les agents chimiosensibilisants de la P-gp présents dans les produits naturels.

## 1.8 Principaux rôles de la P-gp dans les tissus

La P-gp est principalement exprimée chez les cellules épithéliales du corps, mais non exclusivement, et est localisée sur la partie apicale de la membrane. En conséquence, les substrats de la P-gp sont transportés de la partie basolatérale à la partie apicale de l'épithélium, ce qui peut avoir des conséquences dramatiques sur le comportement pharmacologique des substrats médicamenteux. En effet, l'expression constitutive de la P-gp et

d'enzymes de détoxification, peut devenir un important mécanisme de protection cellulaire contre d'éventuels xénobiotiques toxiques (Schinkel et Jonker, 2003; Fromm, 2004). De plus, la localisation anatomique stratégique de la P-gp, fait de cette glycoprotéine un des plus importants transporteurs pour la distribution des médicaments dans l'organisme. Les fonctions associées à la P-gp peuvent être résumées en trois fonctions principales présentées à la figure 1.4 : 1) elle limite l'entrée des médicaments administrés oralement (présente sur les membranes lumineales des entérocytes), 2) elle favorise la détoxification de l'organisme en excréant du sang plusieurs composés toxiques dans la bile et l'urine (présente sur les membranes caniculaires des hépatocytes et à la surface lumineale des membranes des tubules proximaux rénales) ainsi que dans le tractus gastro-intestinal et 3) elle limite l'entrée des médicaments dans les tissus sensibles par sa présence aux barrières biologiques sang-tissus (Schinkel et Jonker, 2003; Fromm, 2004; Régina *et al.*, 2001; Fojo *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1990; Thiebaut *et al.*, 1987; Abu-Quar *et al.*, 2003; Macfarland *et al.*, 1994).

1) Limite l'absorption des médicaments/xénobiotiques.



2) Active l'élimination des médicaments/xénobiotiques.

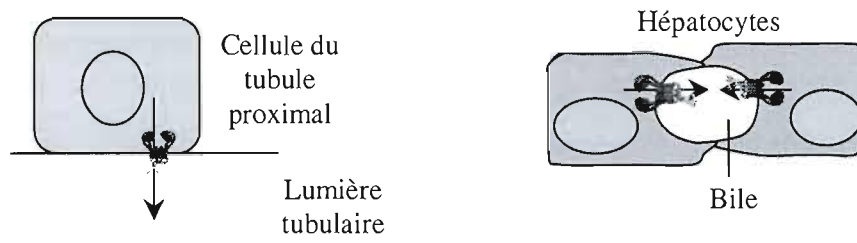
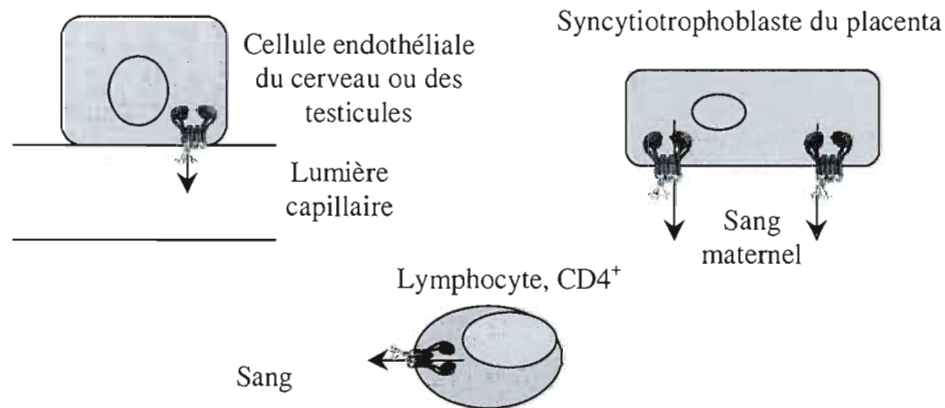


Figure 1.4 : Fonctions principales de la P-gp dans les tissus. 1) L'expression de la P-gp à la surface lumineale des entérocytes limite l'absorption intestinale. 2) Sa présence aux membranes lumineales des cellules du tubule proximal rénal et au niveau des membranes caniculaires des hépatocytes permet l'élimination des xénobiotiques dans l'urine et la bile (Modifiée d'après Fromm, 2004).

3) Limite la distribution des médicaments/xénobiotiques dans les tissus.



Suite Figure 1.4 : Fonctions principales de la P-gp dans les tissus. 3) Sa présence au niveau des barrières sang-tissus ou sang-lymphocytes diminue la distribution des médicaments/xénobiotiques dans ces tissus (Modifiée d'après Fromm, 2004).

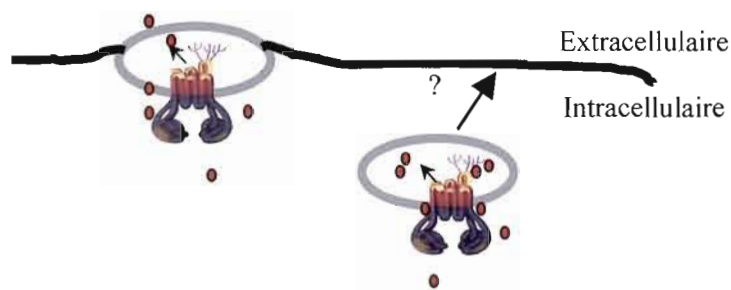
Il en est de même au niveau du système nerveux central (SNC), où l'expression constitutive et la fonctionnalité de la P-gp jouent aussi un rôle important dans l'efficacité pharmacologique et dans la distribution des différents médicaments lors de pathologies du SNC, telles que les tumeurs cérébrales, l'épilepsie et la démence associée au virus de l'immunodéficience acquise humaine (HIV) (Kim, 2003; Loscher et Potschka, 2002). De plus, la P-gp à certain niveau anatomique possède des fonctions excrétrices essentielles, par exemple au niveau des glandes surrénales, elle participe à la sécrétion des stéroïdes, tels que l'aldostérone et le cortisol (van Kalken *et al.*, 1993). Elle participe aussi à l'étiologie et à la pathogenèse de certains désordres neurologiques, tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Récemment, il a été démontré que les peptides  $\beta$ -amyloïdes impliqués dans la pathologie d'Alzheimer, sont des substrats de la P-gp, et cette dernière permet leur sortie du SNC (Lam *et al.*, 2001). Par contre, chez les sujets atteints, les dépôts des peptides  $\beta$ -amyloïdes dans le tissu cérébral sont à la hausse, car les sujets atteints avaient une plus faible expression de la P-gp au niveau de l'endothélium vasculaire du cerveau (Vogelgesang *et al.*, 2002). Inversement, pour les patients souffrant d'épilepsie, c'est à dire que l'expression de la P-gp augmente dans les capillaires cérébraux induisant une résistance aux antiépileptiques (Tishler *et al.*, 1995; Seegers *et al.*, 2002).

Cependant, à l'origine, c'est le développement de souris knock-out pour le gène MDR1 qui a permis de confirmer l'importance de l'expression de la P-gp. En effet, les souris knock-out pour la P-gp se sont avérées viables, fertiles et ne présentaient aucune anomalie. Toutefois, malgré l'absence d'anomalie, Schinkel et al., 1994 a observé une neurotoxicité de 50 à 100 fois supérieure chez ces souris exposées à l'ivermectin, un anti-parasitaire, par rapport aux souris de type sauvage. De plus, lorsque ces souris étaient exposées à différents substrats de la P-gp, tels que la digoxine, la vinblastine ou la doxorubicine, ces souris avaient une accumulation cérébrale de 80 à 100 fois à la hausse de ces substrats. En 1999, cette même équipe de recherche est venue confirmer que l'expression de la P-gp au niveau de l'endothélium vasculaire du cerveau et des testicules, protège ces deux tissus de plusieurs molécules hydrophobes.

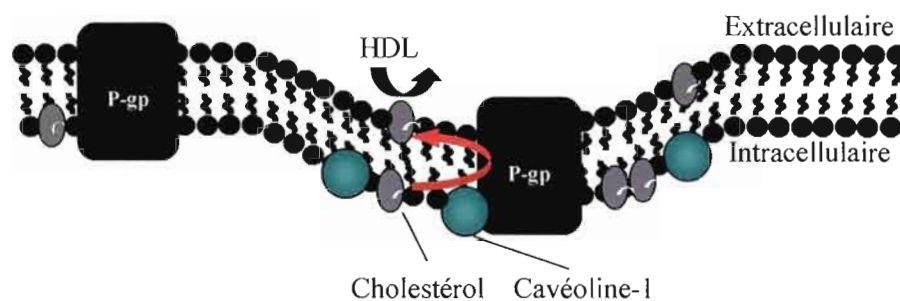
### 1.9 Rôles attribués à la P-gp cavéolaire

La figure 1.5 présente schématiquement trois rôles attribués à la P-gp localisée dans les microdomaines cavéolaires. L'effet de ces rôles procure 1) une diminution de la concentration intracellulaire des médicaments, 2) le transport du cholestérol et la stabilisation des cavéoles et 3) une diminution de la formation de céramide impliquée dans l'induction de l'apoptose. En effet, la P-gp contribue à diminuer la concentration intracellulaire des médicaments en pompant ces derniers à l'extérieur des cellules et à l'intérieur de vésicules cavéolaires, favorisant leur élimination (figure 1.5 a). Plusieurs observations chez les cellules MDR supportent ce rôle de la P-gp dans les cavéoles, dont une augmentation des cavéoles et de leurs constituants (cavéoline-1, sphingolipides et cholestérol) en comparaison avec les lignées parentales sensibles (Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998 et 2001; Yang *et al.*, 1998; Lavie *et al.*, 1999; Lavie et Liscovitch, 2000). La P-gp est localisée dans les cavéoles des cellules MDR (Lavie, *et al.*, 1998; Demeule et al., 2000) et il y a présence de séquestration médicamenteuse dans les vésicules cytoplasmiques des cellules MDR (Abbaszadegan *et al.*, 1996).

a)



b)



c)

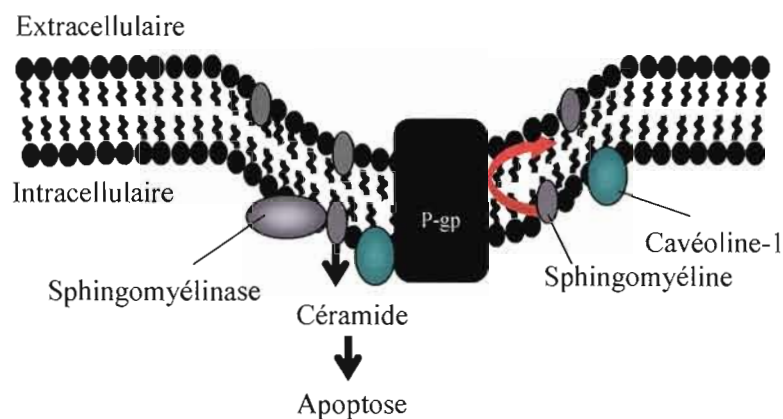


Figure 1.5 : Rôles attribués à la P-gp cavéolaire. a) Diminue l'accumulation intracellulaire des médicaments en les expulsant à l'extérieur de la cellule et/ou en les séquestrant dans des vésicules cavéolaires. b) Assure le transport et l'efflux du cholestérol tout en stabilisant les cavéoles. c) Participe à l'atténuation du signal apoptotique en diminuant la formation de céramide.



Certaines études suggèrent aussi l'implication de la P-gp localisée dans les microdomaines enrichis en cholestérol, les cavéoles et les microdomaines de faible densité, dans les processus de transport et d'estérification du cholestérol (Metherall *et al.*, 1996; Garrigues *et al.*, 2002). Ces microdomaines de la membrane amènent un environnement hautement favorable pour les activités de la P-gp, car ces derniers sont concentrés en cholestérol, entre autres (Jodoin *et al.*, 2003; Luker *et al.*, 2000; Modok *et al.*, 2004; Rothnie *et al.*, 2001; Troost *et al.*, 2004). De plus, le cholestérol interagit directement avec la P-gp au niveau du site de liaison des substrats présent sur la P-gp, suggérant que le cholestérol puisse être transporté par la glycoprotéine (Wang *et al.*, 2000). Il a été proposé que la P-gp transporte le cholestérol du feuillet interne vers le feuillet externe, participant donc à la redistribution du cholestérol dans la membrane plasmique tout en permettant de stabiliser les microdomaines membranaires enrichis en cholestérol (figure 1.5 b) (Garrigues *et al.*, 2002). De plus, la P-gp participe au transport du cholestérol de la membrane plasmique au réticulum endoplasmique, permettant à l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) d'estérifier le cholestérol (Luker *et al.*, 1999). Cependant, d'autres études seront nécessaires pour confirmer le rôle de la P-gp dans l'estérification du cholestérol.

Un autre rôle est sa participation à l'atténuation des voies apoptotiques activées où deux voies classiques existent, la voie mitochondriale et la voie du récepteur CD95 ou récepteur Fas (Johnstone *et al.*, 2000). Lors de dommages cellulaires ou en réponse à un stimulus intracellulaire, la voie mitochondriale est activée et en fonction du ratio des modulateurs du relâchement du cytochrome C, la voie apoptotique mitochondriale sera rapide ou non. Cependant, Sakaeda *et al.*, 2002, ont démontré une augmentation de l'expression de la P-gp par des stimuli apoptotiques et que cette augmentation module le ratio des modulateurs du relâchement du cytochrome C. En effet, chez les cellules de carcinomes cervicaux humains HeLa, le ratio Bax/Bcl-2 diminue ainsi que l'activation des caspases 9 et 3 chez les cellules HeLa surexprimant la P-gp comparativement aux cellules HeLa exprimant peu la P-gp. En conséquence, les stimuli apoptotiques augmentent l'expression de la P-gp et cette surexpression inhibe la voie mitochondriale en modulant à la baisse les modulateurs impliqués dans le relâchement du cytochrome C et diminue l'activation des caspases impliquées dans cette voie (Sakaeda *et al.*, 2002).

Un exemple concret de stimulation apoptotique de la voie mitochondriale est lorsque les cellules sont exposées à des agents chimiothérapeutiques. Ces agents augmentent la concentration cellulaire en céramide, particulièrement au niveau des cavéoles (Bose *et al.*, 1995). La présence d'une concentration cellulaire à la hausse de céramide active la voie apoptotique mitochondriale et stimulent l'expression de la P-gp (Johnstone *et al.*, 2000). Tel que décrit plus haut, un stimulus apoptotique augmente l'expression de la P-gp et cette surexpression atténue la voie mitochondriale en influençant les modulateurs et effecteurs de cette voie. Cependant la surexpression de la P-gp permet aussi de diminuer la concentration cellulaire en céramide, donc il y a amplification de l'atténuation de la voie apoptotique activée. En effet, la sphingomyéline (SM) est un substrat de la P-gp et un précurseur du céramide (Bezombes *et al.*, 1998). L'induction de l'expression de la P-gp permet à cette dernière de transporter plus activement la SM du feuillet interne au feuillet externe de la membrane empêchant la formation du céramide au feuillet interne de la membrane (figure 1.5 c) (Johnstone *et al.*, 2000). De plus, lors des traitements chimiothérapeutiques, la présence à la hausse du céramide induit une surexpression de la P-gp mais aussi de l'enzyme glucosyle céramide synthétase qui ira glycosyler le céramide dans le but d'atténuer le signal apoptotique déclenché par les agents anticancéreux (Lavie et Iscovitch, 2000), ce qui atténue encore davantage le signal apoptotique. Cependant, d'autres études ont démontré que l'induction de l'expression de la P-gp par des stimuli apoptotiques appropriés protège aussi la cellule contre l'apoptose induite par la voie du récepteur CD95 (Robinson *et al.*, 1997; Gollapudi et Gupta, 2001). Toutefois, la P-gp ne protégerait pas la cellule contre l'apoptose induite par la formation de pores membranaires qui induisent la lyse cellulaire, contrairement à ce qui avait été proposé initialement (Johnstone *et al.*, 2000).

#### 1.10 Phénotype de résistance multiple aux médicaments (MDR)

À la lumière des trente dernières années de recherche, le processus de carcinogenèse implique une série complexe de changements génétiques et biochimiques permettant aux cellules transformées de proliférer, de migrer et dans plusieurs cas, d'acquérir les mécanismes nécessaires pour être résistantes à la chimiothérapie. La localisation subcellulaire

de la P-gp dans les microdomaines spécialisés des membranes plasmiques, les cavéoles, fut premièrement identifiée chez les cellules résistantes aux médicaments (Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998; Yang *et al.*, 1999; Demeule *et al.*, 2000). Cette localisation cellulaire serait importante dans le développement de la résistance multiple aux médicaments, car l'association P-gp et microdomaines membranaires riches en cholestérol et en cavéoline-1 est impliquée dans le transport des médicaments (Lavie *et al.*, 1999; Lavie et Liscovitch, 2000).

En effet, un consensus émerge, indiquant que la MDR est un processus multifactoriel, non seulement due à une grande expression de transporteurs, principalement la P-gp, mais aussi à une haute densité cavéolaire. Cette augmentation de la densité cavéolaire implique une expression à la hausse de tous les constituants des cavéoles, tels que la cavéoline-1, les sphingolipides, le glucosylcéramide et le cholestérol (Bosch et Croop, 1996; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998 et 2001; Yang *et al.*, 1998). La relation entre le transporteur, P-gp, et les cavéoles, plus particulièrement, la cavéoline-1, dans la résistance multiple aux médicaments sera élaborée dans le prochain chapitre, « La P-gp et la cavéoline-1 ».

D'autres mécanismes cellulaires, en plus de ceux associés à la P-gp, ont été observés chez les cellules MDR tumorales (Liscovitch et Lavie, 2000; Liang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003): a) un changement dans la composition lipidique membranaire affectant la perméabilité de cette dernière, ce qui provoque une diminution de l'entrée des médicaments dans la cellule, b) diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments à cause de la présence de transporteurs, tels que la P-gp, la MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*), la BRCP (*breast cancer resistance protein*) et LRP (*lung resistance protein*), donc augmentation de l'efflux vers l'extérieur de la cellule, c) augmentation de l'activité d'élimination des médicaments par l'enzyme glutathion S-transférase, d) augmentation de l'activité de réparation de l'ADN par les enzymes O<sup>6</sup>-méthylguanine ADN méthyltransférase et la topoisomérase II, e) inhibition des voies de signalisation apoptotique induite par les médicaments, tels que des agents chimiothérapeutiques, f) le contenu en intégrines et en métalloprotéinases de la matrice extracellulaire est augmenté et ces derniers changements cellulaires sont associés à l'invasion tumorale.

De plus, la MDR ainsi que certaines pathologies peuvent être induites par certains polymorphismes d'un simple nucléotide (SNPs) rapportés au niveau du gène *MDR1*. En effet, les SNPs sont responsables, du moins en partie, des différences inter-individuelles rapportées

au niveau de la pharmacologie et du profil pharmacocinétique des médicaments utilisés. Cependant, l'état des connaissances au sujet des SNPs du gène *MDR1* sort du sujet principal de ce mémoire. Une synthèse des différents résultats de recherche sur les polymorphismes du gène *MDR1* et leur impact sur l'expression et les fonctions de la P-gp au niveau de la barrière sang-cerveau est présentée en annexe à l'appendice B, section 19.4.

### 1.11 Agents chimiosensibilisants de la P-gp

Les agents chimiosensibilisants ou agents réversants sont des molécules, qui en inhibant les activités de transport de la P-gp et/ou son expression, changent l'état des cellules résistantes en cellules sensibles et permettent aux médicaments de pénétrer la cellule, et ainsi atteindre leur (s) objectif (s) thérapeutique (s). Il a été rapporté, suite à plusieurs observations, que certains produits naturels provenant des végétaux et présents dans la diète modulent à la hausse ou à la baisse les activités de transport de la P-gp (Romiti *et al.*, 1998; Jodoin *et al.*, 2002; Castro et Altenberg, 1997; Di pietro *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Ohnishi *et al.*, 2000). En conséquence, plusieurs efforts sont investis dans l'identification de produits naturels ayant des propriétés réversantes, permettant d'inhiber la P-gp, de renverser le phénotype MDR envers différentes médications, et de sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie conventionnelle sans les effets secondaires rapportés avec les inhibiteurs classiques de la P-gp (voir section 1.7, Inhibiteurs de la P-gp). D'autres études s'intéressent à l'identification de produits naturels ayant des propriétés chémopréventives permettant l'élimination rapide de différents agents à potentiel carcinogène et mutagène.

#### 1.11.1 Les produits naturels : modulation de la P-gp

Certains produits naturels de la diète ont un effet d'inhibition sur la P-gp (Zhou, Yong et Chowbay, 2004) dont : a) le curcumin, un polyphénol naturel retrouvé dans les rhizomes de *Curcuma longa*, b) les ginsenosides, de la famille du Ginseng, c) la piperine, un alcaloïde retrouvé en tant que constituant majeur du poivre noir, d) le thé vert avec ses polyphénols de

la famille des catéchines, particulièrement l'épigallocatechine gallate (EGCG), e) certains furanocoumarins, tel que le bergamottin et certains flavanoïdes du jus de pamplemousse, le naringenin, le naringin et le quercetin. Par contre, une équipe a rapporté que l'épicatéchine (EC) du thé vert augmente l'activité *in vitro* de la P-gp. Cette catéchine a augmenté le transport du marqueur fluorescent, LDS-751, sans aucun changement dans le transport de la daunorubicine ou de la rhodamine-123 (R-123), indiquant une possible liaison via l'activation d'un site allostérique permettant l'efflux de composés carcinogéniques (Wang *et al.*, 2002a).

Toutefois, certains produits naturels ont des effets d'induction sur la P-gp tel que l'anti-dépresseur naturel, le *ST. John's Wort*. Ce dernier augmente l'expression intestinale de la P-gp et diminue ainsi la biodisponibilité des médicaments, substrats de la P-gp, qui ont été co-administrés oralement (Durr *et al.*, 2000; Hennessy *et al.*, 2002). Cependant, certains produits naturels modulent à la hausse ou à la baisse les activités de la P-gp, tels que le quercetin et le kaempferol. Ces composés naturels sont des flavanoïdes, retrouvés dans plusieurs légumes et fruits, dont le pamplemousse. Ces composés activent la P-gp à de faible concentration (10  $\mu$ M) et inhibent cette dernière à 50  $\mu$ M. De plus, ces deux composés ont des actions chémopréventives car ils activent l'efflux du carcinogène, 7, 12-diméthylbenz(a)-anthracène (Zhou, Yong et Chowbay, 2004). Toutefois, la combinaison de produits naturels avec des médicaments peut imiter, augmenter ou réduire l'effet de chacun des constituants. Ceci peut résulter à une interaction produits naturels-médicaments causant des variations dans l'efficacité du médicament ou des effets adverses inattendus (Fugh-Berman, 2000; Fugh-Berman et Ernst, 2001). L'explication la plus plausible à ces interactions est une altération de la pharmacocinétique (absorption, métabolisme, distribution et excrétion) des médicaments par les produits naturels. Cependant, les mécanismes d'altérations de la pharmacocinétique des médicaments par les produits naturels sont inconnus (Zhou, Yong et Chowbay, 2004). Toutefois, un nombre croissant d'évidences provenant d'études *in vitro* et *in vivo*, semble indiquer que l'altération de la concentration du médicament co-administré avec le produit naturel amène une induction ou une inhibition des enzymes du métabolisme hépatique et intestinal, en particulier, la P-gp et le cytochrome P450 3A4 (Evans, 2000; Ioannides, 2002; Walter-Sack et Klotz, 1996; Wilkinson, 1997; Zhou *et al.*, 2003). Toutefois, plusieurs études seront nécessaires pour comprendre le ou les mécanisme(s) impliqué(s) dans la modulation

de la P-gp par ces produits naturels ainsi que l'utilisation de ces produits en tant qu'agents chimiosensibilisants et chémopréventifs.

#### 1.11.2 Les furanocoumarins

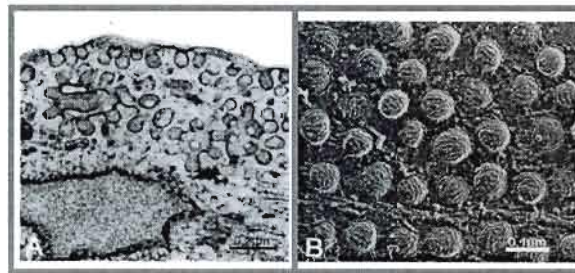
Les furanocoumarins sont présents chez plusieurs végétaux des familles des Rutaceae, Apiaceae et Leguminosae. Plusieurs de ces plantes sont des végétaux communs, tels que le céleri, le persil et le panais. Certains sont utilisés en tant que breuvages, tels que le jus de raisins, jus de pamplemousse, jus de citron, ou en tant qu'épices et herbes médicinales (Barthomeuf *et al.*, 2005). Le rôle biologique des furanocoumarins chez les plantes hôtes n'est pas encore bien compris. Cependant, il est admis que ces composés chimiques sont des phytoalexines qui protègent la plante contre les attaques d'insectes, de virus et de bactéries. Toutefois, certains furanocoumarins peuvent affecter la santé humaine, leurs effets peuvent être bénéfiques ou délétères. Par exemple, l'isopimpinellin, un coumarin du citron, exhibe des activités chémopréventives en bloquant la formation d'adduits d'ADN chez l'homme (Kleiner *et al.*, 2002). Le bergamottin, un furanocoumarin provenant du jus de pamplemousse, affecte les fonctions de transport de la P-gp et les activités métaboliques du cytochrome P450 3A4 en induisant des interactions pharmacocinétiques qui modulent la biodisponibilité et le métabolisme des médicaments (Wang *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2000). Récemment, le cnidiadin, un furanocoumarin présent dans certaines médications traditionnelles chinoises et utilisé en Grèce en tant qu'épice nommée, la *Kafkalithra*, de la plante *Tordylium apulum* de la famille des Apiaceae, inhibe la prolifération des cellules bronchiales de carcinome pulmonaire (Kofinas *et al.*, 1998). En effet, cette étude rapporte que le cnidiadin inhibe la prolifération cellulaire en bloquant le cycle cellulaire à la phase G<sub>1</sub>. Un des objectifs du présent mémoire était de déterminer si le cnidiadin module les activités de la P-gp.

## CHAPITRE II

### ÉTAT DES CONNAISSANCES : LA P-GP ET LA CAVÉOLINE-1

#### 2.1 Les microdomaines cavéolaires et les cavéolines

Premièrement, la double bicouche lipidique de la membrane plasmique possède deux états, un état fluide et un état rigide. Ce dernier état est appelé radeau lipidique et représente certaines portions de la membrane qui existent sous forme de liquide ordonné concentré en cholestérol, en glycosphingolipides et en sphingomyéline, entre autres (Anderson *et al.*, 1998; Razani *et al.*, 2002). Les cavéoles sont des sous-classes des radeaux lipidiques et sont considérées comme des microdomaines spécialisés de la membrane plasmique (Lavie et Liscovitch, 2000). Ces microdomaines sont présents au niveau des membranes sous la forme d'invaginations membranaires et de vésicules juxtamembranaires seules ou groupées (Anderson, 1998) (voir figure 2.1).



(Anderson, 1998)

Figure 2.1 : Microscopie électronique des microdomaines cavéolaires. A) Coupe mince de fibroblaste présentant les invaginations de la membrane et les vésicules juxtamembranaires, seules ou regroupées des cavéoles. B) Les vésicules cavéolaires sont recouvertes du côté cytoplasmique de la membrane par les cavéolines où leur imbrication en épingle à cheveux dans la membrane vésiculaire procure des striations bien définies.

Ces microdomaines cavéolaires sont des sites importants d'évènements dynamiques et de régulation métabolique au niveau de la membrane plasmique. En effet, les cavéoles sont impliquées dans le transport des protéines et des lipides, dans la signalisation intracellulaire,

la transcytose, l'endocytose et la potocytose (Shaul *et al.*, 1998; Schnitzer *et al.*, 1994; Engelman *et al.*, 1998; Jodoin *et al.*, 2003). Les cavéoles permettent l'agrégation de plusieurs protéines et lipides dans une structure liquide hautement ordonnée et compactée essentielle pour la transduction des signaux cellulaires et intracellulaires. En effet, les cavéoles sont considérées comme des organelles de signalisation spécialisées où le terme signalosome leurs a été attribuées, car elles semblent permettre l'intercommunication entre les différentes voies intracellulaires de signalisation (Razani *et al.*, 2002).

Plusieurs molécules, dont de nombreuses protéines de signalisation, sont enrichies au niveau des cavéoles. Voici une liste abrégée des molécules enrichies au niveau des cavéoles : a) des lipides; cholestérol, sphingomyéline, b) des récepteurs couplés aux protéines G; récepteur adrénergique, cholecystokinine, c) des protéines G; G $\alpha$ s, G $\alpha$ i, d) des protéines membranaires; P-gp, transporteur de glucose-4 (Glut-4), e) plusieurs récepteurs de facteurs de croissance; récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (R-PDGF), récepteur du facteur de croissance épithélial (R-EGF), récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (R-VEGF), f) des protéines structurales; cavéolines, dynamine, actine, g) des kinases et autres enzymes; protéine kinase A (PKA), kinase extracellulaire régulée par un signal (ERK), l'oxide nitrique synthétase endothéliale (eNOS), la cyclooxygénase-2 (Cox-2), h) des GTPases (protéine liant le guanosine 5'-triphosphate); H-ras (séquence associée au rétrovirus), RhoA, i) des protéines cellulaires et adaptatrices; SOS (*Son-of-sevenless*), protéine 2 liée au récepteur des facteurs de croissance (GRB2), j) des protéines nucléaires et autres; récepteur de l'androgène et de l'estrogène, ainsi que la protéine du prion (Anderson *et al.*, 1998 ; Razani *et al.*, 2002).

Cependant, plusieurs protéines localisées dans les cavéoles, ont subi des modifications lipidiques, telles que des ajouts de groupements myristoyle, palmitoyle et prényle. Par contre, ces modifications lipidiques ne sont pas un critère absolu pour la localisation des protéines au niveau des cavéoles (Song *et al.*, 1997). Les cavéoles sont retrouvées chez la majorité des types cellulaires, mais elles sont particulièrement abondantes chez les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les pneumocytes de type I et chez les myocytes (Razani *et al.*, 2002). De plus, ces microdomaines cavéolaires sont aussi nommés domaines striés de la membrane plasmique à cause du recouvrement des vésicules par une



famille de protéines structurales, les cavéolines (voir figure 2.1 B) (Anderson *et al.*, 1998; Razani *et al.*, 2002).

Les cavéolines sont des protéines fortement exprimées chez les cellules différenciées où trois gènes encodant pour ces protéines de structure ont été identifiés : la cavéoline-1, la cavéoline-2 et la cavéoline-3 (cav-1, cav-2 et cav-3). Les cav-1 et 2 sont généralement coexprimées et omniprésentes chez les adipocytes, les endothéliums, les cellules du muscle lisse et les pneumocytes de type I, sous la forme de deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$ , pour la cav-1 et  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  pour la cav-2 (Scherer *et al.*, 1997). Il est à noter, que l'isoforme  $\alpha$  représente la protéine complète et les deux autres isoformes, sont la conséquence d'un site alternatif d'initiation de la transcription (Scherer *et al.*, 1997). Tandis que la cav-3 est principalement exprimée chez les cellules musculaires et gliales (Tang *et al.*, 1996; Ikezu *et al.*, 1998). Cependant, la cav-1 étant la principale protéine de structure des cavéoles, la suite de ce chapitre fera état des connaissances sur cette cavéoline en particulier.

## 2.2 Expression de la cavéoline-1 dans le phénotype d'oncogenèse et de la MDR

À la lumière de plusieurs études, l'expression de la cav-1 varie en fonction de la spécialisation de la cellule. C'est à dire, que le niveau d'expression de la cav-1 et son impact sur les fonctions cavéolaires varient des états cellulaires différenciés, à ceux passant par l'acquisition des propriétés oncogéniques, à l'acquisition de la MDR. Ceci semble due à des propriétés anti-prolifératives (oncosuppressives) et pro-survie de la cav-1 (Lavie et Liscovitch, 2000). En effet, la cav-1 et les cavéoles sont grandement exprimées chez les cellules en différenciation cellulaire terminale, telles que les adipocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires (Scherer *et al.*, 1994; Lavie et Liscovitch, 2000).

Il a été démontré aussi que l'ARN messager (ARNm) de la cav-1 et son expression protéique sont réduits ou absents chez la majorité des lignées cellulaires en transformation oncogénique et chez les cellules tumorales, telles que chez plusieurs lignées cellulaires tumorales mammaires, pulmonaires, pancréatiques et ovariens (Koleske, Baltimore et Lisanti, 1995; Lee *et al.*, 1998; Engelman *et al.*, 1998; Racine *et al.*, 1999; Hurlstone *et al.*, 1999). Plusieurs comparaisons au niveau moléculaire ont été effectuées entre les cellules normales

différenciées et les cellules transformées. Ces études ont démontré que la cav-1 est un des produits géniques qui est fortement régulé à la baisse chez les carcinomes mammaires humains et chez plusieurs autres cellules transformées et tumorales (Sager *et al.*, 1994; Koleske, Baltimore et Lisanti, 1995; Okamoto *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2002a ). En accord avec la diminution ou l'inhibition de l'expression de la cav-1, le gène humain de la cav-1 est localisé sur un locus suppresseur de tumeur (7q31.1/D7S522) qui est fréquemment supprimée chez plusieurs types de cancer (Engelman, Zhang et Lisanti, 1998a, 1999; Koleske, Baltimore et Lisanti, 1995). De plus, les activités oncosuppressives de la cav-1 sont supportées par différentes études, montrant que l'expression de la cav-1 inhibe la signalisation mitogénique (Engelman *et al.*, 1998, 1997) et inhibe la prolifération cellulaire (Lee *et al.*, 1998; Smart *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1998). La cav-1 est conséquemment régulée à la baisse chez les cellules cancéreuses transformées et régulée à la hausse chez les cellules en état de différenciation terminale accompagnée par une prolifération lente. Cependant, la régulation à la baisse de la cav-1 semble suffisante mais n'est pas une condition essentielle pour la transformation cellulaire (Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001).

Par contre, lors de l'acquisition de la MDR, la densité cavéolaire est grandement augmentée et l'expression de la cav-1 est à la hausse (Lavie et Liscovitch, 2000; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001). Cette augmentation d'expression de la cav-1 suggère que les cellules MDR récupèrent un marqueur important des cellules différenciées non transformées, qui a été perdu lors de la transformation cellulaire. En effet, chez les cellules transformées, la cav-1 est faiblement exprimée mais la cycline-D1 est surexprimée (Hulit *et al.*, 2000). Cette dernière est associée à une régulation positive de la transformation cellulaire. Ce qui implique qu'une cellule transformée qui acquière le phénotype MDR, l'expression de la cav-1 semble réprimer la transcription du gène de la cycline-D1. En conséquence, l'expression de la cav-1 contribue à inhiber les signaux de prolifération et de transformation cellulaire. La figure 2.2 résume les variations dans l'expression de la cav-1 en fonction de l'état cellulaire différencié, de l'état cellulaire de transformation et de l'acquisition de la MDR.

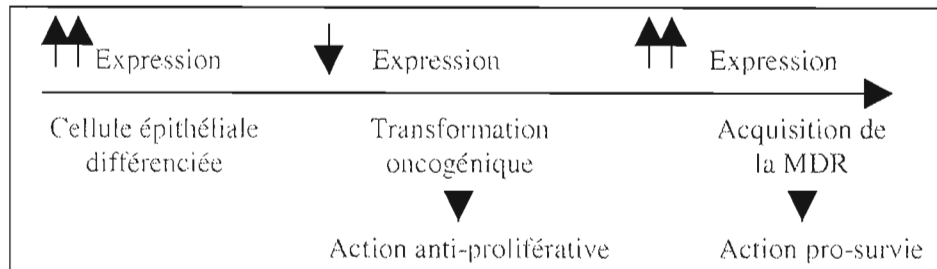


Figure 2.2 : Changement dans l'expression de la cavéoline-1. Variation de son expression durant la différenciation cellulaire, la transformation oncogénique et lors de l'acquisition de la résistance multiple aux médicaments (modifiée d'après Lavie et Liscovitch, 2000).

### 2.3 Structure de la cavéoline-1

La cav-1 possède 178 acides aminés avec une identité de séquence de 38% avec la cav-2 et de 65% d'identité avec la cav-3 (Razani *et al.*, 2002). Récemment, l'étude structurale de la cav-1 a permis d'identifier les portions protéiques impliquées dans l'interaction avec elle-même, avec les autres protéines ainsi qu'avec la membrane plasmique (Schlegel et Lisanti, 2000). Les domaines identifiés de la cav-1 sont le domaine d'oligomérisation (DO) des acides aminés 61 à 101, permettant la formation d'un dimère où les dimères de cav-1 sont reliés entre eux par leur domaine terminal (DT) des acides aminés 168 à 178. Les domaines d'inhibition de la cav-1 (DIC) et de *scaffolding* (SCD ou domaine d'échafaudage moléculaire), des acides aminés 102 à 134 et 82 à 101, respectivement, permettent l'interaction de la cav-1 avec différentes protéines. Toutefois, l'attachement de la cav-1 à la membrane se fait via les domaines transmembranaires (DTM des acides aminés 168 à 178), le SCD et le DIC.

### 2.3.1 SCD (*scaffolding domain*) de la cavéoline-1

Ce domaine de la cav-1 est constitué des acides aminés D<sub>82</sub>GIWKASFTTFTVTKYWFYR<sub>101</sub> et est impliqué dans l'interaction entre la cav-1 et plusieurs protéines localisées dans les microdomaines cavéolaires. Les protéines interagissant avec la cav-1 possèdent un motif consensus de liaison à la cav-1 où trois motifs ont été identifiés :  $\phi X \phi XXXX \phi XX \phi$ ,  $\phi X \phi XXXX \phi$ ,  $\phi XXXX \phi XX \phi$ , où  $\phi$  représente un acide aminé aromatique, Phénylalanine (Phe), Tyrosine (Tyr) ou Tryptophane (Trp), et X représente un acide aminé quelconque (Couet *et al.*, 1997). Le SCD de la cav-1 est directement impliqué dans l'agrégation moléculaire essentielle pour la transduction des signaux cellulaires et intracellulaires des différentes molécules retrouvées dans les cavéoles. Ce domaine de la protéine structurale des cavéoles est un point d'ancrage et d'échafaudage moléculaire dans l'établissement d'une structure liquide hautement ordonnée et compactée. Cet échafaudage moléculaire suggère l'intercommunication entre les différentes voies intracellulaires de signalisation reliées entre elles, tout en empêchant l'intercommunication entre les voies signalétiques non reliées entre elles (Razani *et al.*, 2002; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001; Engelman *et al.*, 1998). La figure 2.3 présente schématiquement l'organisation en épingle à cheveux de la cav-1 au niveau de la membrane plasmique.

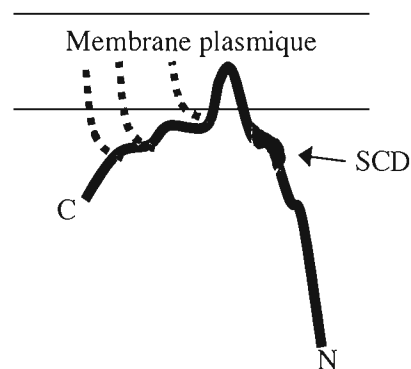


Figure 2.3 : La cavéoline-1 imbriquée dans la membrane plasmique. Présence de trois sites palmitoylés (en pointillé) dans la portion C-terminale et du site d'ancrage et d'échafaudage moléculaire (SCD) de la portion N-terminale de la cav-1 (Modifié de Razini *et al.*, 2002).

### 2.3.2 Signalisation intracellulaire

Autre qu'un point d'échafaudage structurel, le SCD de la cav-1 module l'activité des protéines de signalisation intracellulaire (Okamoto *et al.*, 1998; Labrecque *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 1998; Liou *et al.*, 2001). En effet, plusieurs molécules de signalisation sont inhibées suite à une interaction directe avec le SCD de la cav-1, telles que la protéine eNOS, la protéine kinase C (PKC), les récepteurs EGFR et VEGFR-2 (Okamoto *et al.*, 1998; Labrecque *et al.*, 2003). Il est à noter que les cavéolines, dont la cav-1, interagissent particulièrement bien avec les récepteurs à tyrosine kinases et les protéines G, où un peptide synthétique représentant la séquence SCD de la cav-1 est suffisant pour inhiber leur activité enzymatique (Engelman *et al.*, 1998). Cependant, le SCD de la cav-1 peut activer la voie de signalisation du récepteur de l'insuline en induisant des phosphorylations activatrices en aval de cette voie métabolique (Yamamoto *et al.*, 1998). Par contre, pour d'autres protéines, cette interaction ne module ni à la hausse, ni à la baisse leurs activités, tel que la Cox-2 (Liou *et al.*, 2001). En plus de cette organisation structurelle et des propriétés du SCD de la cav-1 à moduler les protéines de signalisation, ce dernier inhibe des molécules de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, tels que H-Ras, c-Src, Raf-1, Mek, Erk2 et autres (Smart *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1998).

Les mécanismes par lesquels la cav-1 induit cette inhibition proliférative, semblent être dus à ses multiples interactions directes de son domaine SCD avec différentes molécules impliquées dans l'activation de la prolifération cellulaire. En effet, dans plusieurs cas, des activations mutationnelles de molécules de signalisation empêchent la régulation négative de ces dernières par le SCD de la cav-1 (Engelman *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1998). Par exemple, chez plusieurs cancers humains, la GTPase, H-Ras et la protéine G $\alpha$ s, ces molécules ont subi des mutations qui bloquent la régulation négative du SCD de la cav-1, aboutissant à une prolifération cellulaire excessive (Engelman *et al.*, 1998). Il est possible de considérer, à la lumière des différentes études sur l'interaction entre le SCD de la cav-1 et des molécules présentes dans les cavéoles, que la cav-1 exhibe une modulation négative des voies métaboliques oncogéniques, empêchant donc la prolifération cellulaire (Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001).

Cependant, tout comme chez plusieurs protéines d'échafaudage (*scaffolding*), le SCD de la cav-1 permet de restreindre la distribution subcellulaire et de contrôler les activités des molécules de signalisation (Engelman *et al.*, 1998; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001). De part son importance structurelle et fonctionnelle au niveau du dynamisme cavéolaire, la cavéoline-1, est un joueur clé dans d'importantes fonctions cavéolaires, dont le transport et l'efflux du cholestérol.

#### 2.4 La cavéoline-1 protéine structurale des cavéoles et son implication dans le transport cavéolaire

D'un point de vue structurel, les souris knock-out envers la cav-1 se sont avérées être dépourvues de cavéoles, permettant de confirmer que la cav-1 est une protéine de structure importante pour la formation des microdomaines cavéolaires de la membrane. Toutefois, autre que la structure cavéolaire, d'autres anomalies ont été observées chez ces souris knock-out (Razini et Lisanti, 2001b; Lee *et al.*, 2002b; Cohen *et al.*, 2003a, 2003b), dont des hypertrophies des cellules cardiaques, dédifférenciation cellulaire des adipocytes et hyperplasie de l'épithélium chez les cellules mammaires. De plus, plusieurs perturbations au niveau de la signalisation intracellulaire ayant pour conséquences des retenues des protéines à ancrage GPI (Glycosylphosphatidyl inositol) dans l'appareil de Golgi, des hyperactivations de ERK et des activations de la protéine eNOS chez les fibroblastes, une diminution marquée de l'expression de la cav-2 et du récepteur à l'insuline due à une dégradation accrue de ces protéines par le protéasome (Razini et Lisanti, 2001b; Lee *et al.*, 2002b; Cohen *et al.*, 2003a, 2003b). De plus chez les adipocytes, l'endocytose de l'albumine est diminuée, il y a augmentation de la prolifération cellulaire, diminution de l'expression du récepteur à l'insuline et développement d'une résistance à l'insuline (Razini et Lisanti, 2001b; Lee *et al.*, 2002b; Cohen *et al.*, 2003a, 2003b). Ces anomalies observées chez les animaux knock out envers la cav-1 ont démontré l'importance fonctionnelle de cette protéine dans la formation des cavéoles, la signalisation intracellulaire et dans le transport vésiculaire.

Il est à noter que plusieurs molécules pénètrent la cellule en utilisant la voie des cavéoles via l'affinité de ces molécules pour le SCD de la cav-1, telles que l'albumine, le folate, la

phosphatase alcaline, les toxines cholérique et tétanique (Montesano *et al.*, 1982; Schnitzer *et al.*, 1994). Par contre, la destination des différentes molécules transportées dans les vésicules cavéolaires est variée et peu documentée, mais elles semblent se diriger vers la membrane basolatérale, les endosomes, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. De plus, les cavéoles peuvent fusionner entre elles pour former des cavéosomes, qui sont de larges organelles de nature non endosomiales et non lysosomiales, qui se dirigent par la suite, vers le réticulum endoplasmique (Pelkmans *et al.*, 2001). Toutefois, les différentes étapes d'invaginations de la membrane plasmique et la formation des vésicules juxtamembranaires, demeurent peu connues. Cependant, lors de purification des cavéoles, les analyses moléculaires ont montré que les cavéoles possèdent les protéines impliquées dans la formation, le bourgeonnement et la fusion des vésicules, telles que la dynamine, la NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*), les SNAP (*soluble NSF attachment proteins*) et la VAMP (*vesicle-associated membrane protein*) (Schnitzer *et al.*, 1995). Les mécanismes impliqués dans la régulation de la transition entre les cavéoles attachées à la membrane et les cavéoles intracellulaires, restent à être identifiés.

Cependant, le transport vésiculaire au niveau des cavéoles peut être de type transcytose, où les protéines ou molécules sont transportées du côté apical d'une cellule endothéliale vers le compartiment basolatéral. Toutefois, les protéines ou molécules peuvent être également endocytosées et distribuées vers différents organelles intracellulaires, tels que les cavéosomes, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cependant, la morphologie et l'abondance des cavéoles chez les cellules endothéliales suggèrent que les cavéoles sont les principales vésicules de transport chez ce type cellulaire. Des études ont montré que suite à des marquages *in situ* de protéines enrichies dans les cavéoles de cellules endothéliales de poumon, que la transcytose est un transport spécifique à ces microdomaines cavéolaires (Schnitzer *et al.*, 2001). Par contre, le transport endocytaire n'est pas spécifique aux cavéoles présentes chez les cellules endothéliales, mais est aussi associé aux vésicules recouvertes de clathrine.

Cependant, certaines protéines, dont des récepteurs et macromolécules extracellulaires, sont préférentiellement internalisés par les cavéoles, tels que le folate, l'albumine, la phosphatase alcaline, le virus simiens (SV40), différentes souches d'*Escherichia coli*, et les toxines cholérique et tétanique, entre autres (Schnitzer *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1996;

Shin *et al.*, 2000; Montesano *et al.*, 1982; Herreros *et al.*, 2001 ; Wolf *et al.*, 2002). Autre que le transport vésiculaire des différentes molécules retrouvées dans le système cavéolaire, il a été rapporté que les cavéoles et la cav-1 sont impliquées dans le transport et l'homéostasie du cholestérol intracellulaire (Razini *et al.*, 2002).

En effet, la cav-1 possède une grande affinité envers le cholestérol et il a été démontré que le cholestérol demeure lié à la cav-1, même en présence de détergents, tel que le SDS (Murata *et al.*, 1995). De plus, cette même équipe a rapporté, que lorsque la cav-1 et le cholestérol sont hautement concentrés à certains niveaux membranaires, il y avait une réorganisation moléculaire de la membrane plasmique en invagination cavéolaire (Murata *et al.*, 1995). L'équipe de Rothberg *et al.*, 1992 a observé que les structures invaginées des cavéoles sont sensibles aux déplétions cellulaires en cholestérol. Par la suite, d'autres études se sont rajoutées à celles-ci, et il a été proposé que la cav-1 joue un rôle principal dans le transport du cholestérol et dans l'homéostasie cellulaire de celui-ci. En effet, lorsque qu'il y a un apport externe de cholestérol à la cellule, suite à des incubations avec des LDL (low density lipoproteins), l'excès cellulaire de cholestérol est retrouvé dans les cavéoles lié à la cav-1. Par la suite, ce cholestérol cavéolaire est retrouvé localisé au feuillet externe de la membrane plasmique, pour y être éventuellement pris en charge par les HDL (High density lipoproteins) (figure 1.5 b) (Fielding, 1995). Cependant, lorsque le cholestérol est nouvellement synthétisé dans le réticulum endoplasmique, celui-ci lie la cav-1 et d'autres molécules pour former un complexe cytosolique (Uittenbogaard *et al.*, 1998). Ce complexe est, par la suite, acheminé du réticulum endoplasmique vers les cavéoles et des cavéoles à la membrane plasmique, par une voie dépendante de la cav-1 (Smart *et al.*, 1996). Une fois à la membrane, le cholestérol peut être pris en charge par les lipoprotéines extracellulaires, les HDL, et la cav-1 peut retourner vers les organelles golgiennes et du réticulum endoplasmique pour recommencer le cycle (Fielding, 1995). De plus, la suppression de la cav-1 fait augmenter l'efflux du cholestérol cellulaire, perturbant donc la constance du niveau intracellulaire en cholestérol (Fielding *et al.*, 1999), suggérant que la cav-1 permet de maintenir constant le niveau cellulaire en cholestérol. En conséquence, les cavéoles, plus particulièrement la cav-1, sont impliquées dans le transport et l'efflux du cholestérol où la cav-1 semble contrôler l'homéostasie cellulaire du cholestérol. En effet, à l'intérieur du promoteur de la cav-1, il y a présence de deux éléments de régulation par les stérols (SREs,



*sterol regulatory elements*) qui modulent l'expression transcriptionnelle de la cav-1 en fonction des fluctuations cellulaires du cholestérol libre (Bist *et al.*, 1997). De plus, la protéine SR-BI (*Scavenger receptor class B type I*), qui agit comme récepteur des HDL, est enrichie dans les cavéoles (Graf *et al.*, 1999).

## 2.5 Colocalisation cavéolaire de la P-gp : interaction P-gp/cavéoline-1

Tel que décrit dans le chapitre I, la P-gp cavéolaire fait actuellement l'objet d'études visant à mieux comprendre l'importance de cette localisation subcellulaire pour ses fonctions de transport et d'élimination des médicaments. Il a été proposé que la population de P-gp localisée dans les cavéoles pourrait contribuer à diminuer la concentration intracellulaire des médicaments en pompant ces derniers à l'intérieur des vésicules juxtamembranaires, pour être éventuellement éliminés. De plus, plusieurs études ont rapporté que lors de cette colocalisation, la P-gp interagit directement avec la cav-1 (Okamoto *et al.*, 1998; Razini *et al.*, 2001; Demeule *et al.*, 2000; Jodoin *et al.*, 2003). En effet, la P-gp contient dans sa portion N-terminale, comme chez plusieurs autres protéines, un motif consensus de liaison à la cav-1. Ce motif de liaison à la cav-1 se situe entre les résidus 37 à 45 : FSMFRYSNW, où les deux premiers résidus de la séquence débutent à l'exon 3 pour se terminer dans l'exon 4 de la P-gp (voir la figure 2.4). Lors d'une première étude, évaluant l'effet de l'interaction entre la P-gp et la cav-1 sur l'activité de transport de la P-gp, nous avons surexprimé chez les cellules Cos-7, la P-gp humaine de type sauvage (MDR1) et deux P-gp humaines mutées au site de liaison à la cav-1, YWAA et F37A (Jodoin *et al.*, 2003). Il est à noter que les acides aminés aromatiques, tyrosine et tryptophane, aux positions 42 et 45, ont été remplacés par des alanines chez le mutant YWAA et la phénylalanine à la position 37 a été remplacée par une alanine chez le mutant F37A (tableau 2.1). Par la suite, notre équipe a montré, par des études de co-immunoprécipitation de P-gp et de cav-1, que les cellules transfectées avec les P-gp mutées au motif de liaison à la cav-1, avaient une interaction physique diminuée en moyenne de 37% en comparaison avec la P-gp non mutée (tableau 2.1) (Jodoin *et al.*, 2003). De plus, lors d'essai d'activité de transport par accumulation intracellulaire du substrat fluorescent Hoechst 33342, les deux P-gp mutantes avaient en moyenne 33% moins d'accumulation

intracellulaire du substrat fluorescent en comparaison avec la P-gp non mutée (Jodoin *et al.*, 2003).

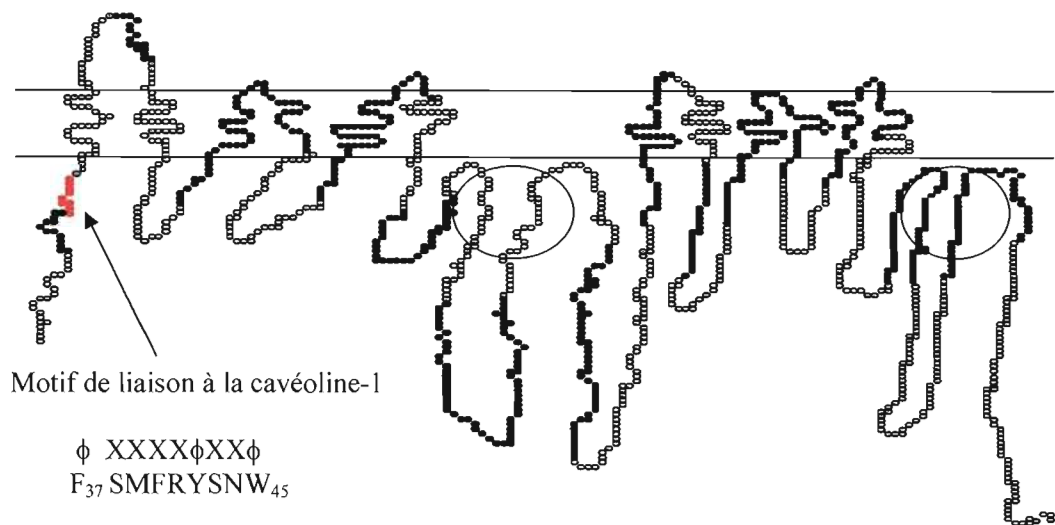


Figure 2.4 : Schématisation de la P-gp avec son motif de liaison à la cavéoline-1. Structure secondaire de la P-gp présentant la distribution des 1280 acides aminés formant ses 28 exons, son motif de liaison à la cavéoline-1 (en rouge) et ses deux sites de liaison à l'ATP (cercle). (modifié d'après Pauli-Magnus et Kroetz, 2004)

Tableau 2.1 Diminution de l'interaction P-gp/cavéoline-1 chez les mutants de la P-gp

Motif de liaison à la Cavéoline	Φ XXXXΦ XXΦ	Interaction P-gp et Cav-1 (%)
MDR1	F <sub>37</sub> SMFR Y <sub>42</sub> SNW <sub>45</sub>	100 ± 0
YWAA	F <sub>37</sub> SMFR A <sub>42</sub> SN A <sub>45</sub>	73 ± 2*
F37A	A <sub>37</sub> SMFR Y <sub>42</sub> SN W <sub>45</sub>	52 ± 8*

(Jodoin *et al.*, 2003 ; \* = *t*-test de student significatif lorsque *p*< 0,05)

## 2.6 Relation entre la P-gp et la cavéoline-1 dans la MDR

La relation entre la P-gp et la cav-1 dans la MDR est peu connue. Il a été rapporté que la cav-1 et la P-gp interagissent physiquement entre-elles, chez les cellules cancéreuses mammaires humaines résistantes à la doxorubicine, les Hs578T/doxo (Cai et Chen, 2004), ainsi que chez les cellules endothéliales bovines et rénales de singe, les BBCEC (*bovine brain capillary endothelial cells*) et les cellules Cos-7 transfectées avec la P-gp humaine (Jodoin *et al.*, 2003). L'équipe de Cai et Chen, 2004 a montré que les cellules Hs578T/doxo, expriment fortement la P-gp mais peu de cav-1, et lorsque ces mêmes cellules sont transfectées avec la cav-1, la surexpression de la cav-1 change l'état cellulaire de cellules résistantes en cellules sensibles. Toutefois, la surexpression de la cav-1 chez les cellules Hs578T/doxo a modifié la composition lipidique de la membrane. En effet, la fluidité de la membrane plasmique fut augmentée par une perte de 30% du cholestérol plasmatique (Cai, Zhu et Chen, 2004). Les travaux de Chen, 2004 suggèrent que la modulation négative de la P-gp par la cav-1 peut être due à deux mécanismes : 1) une interaction physique entre les deux protéines au niveau des cavéoles, ce qui induit une inhibition fonctionnelle des activités de transport de la P-gp et inverse l'état de cellules résistantes en cellules sensibles (Cai et Chen, 2004), 2) présence d'un mécanisme alternatif indirect qui inhibe les activités de transport de la P-gp lorsqu'il y a augmentation de la fluidité membranaire induite par une surexpression de la cav-1 (Cai, Zhu et Chen, 2004). Toutefois, chez les même cellules, les Hs578T/doxo, il a été rapporté que la surexpression de la cav-1 supprime l'expression de la P-gp au niveau transcriptionnel (Zhu, Cai et Chen, 2004). En accord avec le premier mécanisme rapporté par l'équipe de Chen, l'étude de Jodoin *et al.*, 2003 sur des cellules non cancéreuses rapporte une régulation négative des activités de transport de la P-gp, provoquée par l'interaction physique entre le SCD de la cav-1 et le motif de liaison à la cav-1 sur la P-gp.

Cependant, en considérant que la P-gp et la cav-1 interagissent physiquement, les gènes MDR1 et celui de la cav-1 devraient être régulés en coordination un de l'autre. En effet, une régulation en coordinance de deux mécanismes de la MDR a été rapporté, c'est à dire que l'expression de la P-gp, la pompe à efflux et la cav-1, la protéine pro-survie, sont hautement corrélées chez les cellules de la moelle osseuse humaine normale, leucémique, en rémission

et en régénération (Pang, Au et Kwong, 2004). Ces dernières études soulèvent la possibilité que l'émergence des différents mécanismes dans le processus de la MDR pourraient être régulés en coordination, particulièrement ceux des produits géniques, MDR1 et cav-1. Cette hypothèse de régulation coordonnée entre la P-gp et la cav-1 supporte l'hypothèse d'adaptation cellulaire où la relation entre la cav-1 et la MDR semble être liée aux fonctions de transport et d'efflux du cholestérol.

Cette voie métabolique d'adaptation cellulaire est soupçonnée faciliter le transport des médicaments des compartiments intracellulaires à la membrane plasmique, pour être pris, par la suite, en charge par les différents transporteurs présents à la membrane plasmique (Lavie et Liscovitch, 2000; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001). C'est à dire, que la colocalisation cavéolaire de la P-gp et de la cav-1 ainsi que leur rôle dans le transport intracellulaire du cholestérol, seraient la base du processus MDR. Ce processus MDR nécessiterait dans ce cas, deux étapes essentielles: 1) un efflux intracellulaire actif de cholestérol et 2) présence des pompes à efflux à la membrane plasmique (Lavie et Liscovitch, 2000; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001). Premièrement, les médicaments interagissent avec la bi-couche lipidique de la membrane par diffusion et iront se partitionner dans les différentes phases des nombreuses membranes intracellulaires avant d'atteindre l'échafaudage moléculaire formé par la cav-1 lors du transport et efflux du cholestérol. Deuxièmement, par ce même échafaudage moléculaire, les médicaments parviendront à la membrane plasmique dans les domaines riches en cholestérol et en cav-1, où la P-gp et d'autres transporteurs rapportés pour y être localisés, les excluront finalement de la cellule. Cette voie métabolique d'adaptation cellulaire et d'acquisition du phénotype MDR peut être outrepassée chez les cellules MDR exprimant peu de cav-1, par un ou plusieurs mécanismes inconnus (Lavie et Liscovitch, 2000; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001). Cependant, la voie métabolique d'adaptation cellulaire proposée, n'exclut pas les autres mécanismes décrits à la section 1.10.

## 2.7 But de la recherche

La P-glycoprotéine agit comme une pompe à efflux et expulse activement hors de la cellule une grande variété de molécules hydrophobes, c'est à dire la majorité des

médicaments anticancer. De par sa fonction de transport et de ses localisations anatomiques stratégiques, la P-gp induit des échecs aux traitements chimiothérapeutiques, limite la biodisponibilité des médicaments tout en favorisant une résistance multiple à différents types de médicaments, la MDR. Le but de cette étude est d'évaluer les capacités inhibitrices sur les activités de liaison et de transport des substrats de la P-gp, par différentes molécules : 1) au niveau de produits naturels présents dans la diète quotidienne, tel que les coumarins et 2) au niveau de molécules endogènes retrouvées dans le microenvironnement cavéolaire de la P-gp, soit la cav-1. Deux objectifs découlent du but de l'étude : évaluation et identification de la relation structure-activité la plus appropriée pour, soit renverser le phénotype MDR, soit augmenter la biodisponibilité des agents administrés, chez six molécules naturelles de la famille des coumarins. Par la suite, caractérisation de l'impact du niveau d'interaction entre la cav-1 et la P-gp sur l'activité de liaison et de transport des substrats de la P-gp, ainsi que sur le phénotype MDR. En ajout à l'hypothèse d'adaptation cellulaire décrite à la section 2.5, nous pensons, que le niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 peut moduler les activités associées à la P-gp et ainsi moduler la MDR.

## CHAPITRE III

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1 Matériel

L'anticorps monoclonal de souris C-219 provient des laboratoires *ID* (London, Ontario, Canada) et reconnaît deux épitopes linéaires internes, VQEALD de la portion C-terminal, et VQAALD de la portion N-terminal chez les isoformes de la P-gp ; de classe I, II et III d'hamster, classe I et III chez l'humain et classe II et III chez la souris (Georges *et al.*, 1990). Le clone 2297 dirigé contre la cavéoline-1 est obtenu des laboratoires *BD Transduction* (Lexington, KY, USA). La cyclosporine A (CSA), la diazirine-CsA (dz-CsA ou SDZ 212-122) et l'anticorps monoclonal dirigé contre la CSA sont une gracieuseté de Novartis Pharma Canada Inc. L'anticorps secondaire d'IgG d'anti-souris conjugué à la HRP (*Horse Radish Peroxidase*) provient de chez *Jackson ImmunoResearch Laboratories* (West grove, PA, USA) et le réactif chémiluminescent (ECL) de chez NEN (Boston, MA, USA). Le sérum de veau et de veau fœtal (BSC et FBS) proviennent de chez Medicorp (Montréal, Québec, Canada). La phalloïdine-rhodamine Alexa Fluor et l'anti-souris d'IgG de chèvre Alexa Fluor proviennent de chez *Molecular Probes* (Eugene, OR, USA). L'antibiotique utilisé comme agent de sélection, la généticine (G-418 sulfaté), provient de chez Gibco BRL (Paisley, Écosse). Les plasmides pCI-neo-MDR1 et les plasmides mutés pCI-neo-F37A-MDR1 et YWAA-MDR1 nous ont été gentiment fournis par les Dr Christopher F. Higgins et Kenneth J. Linton (Imperial College de London). Le cnidiadin est une gracieuseté du Dr Chantal Barthomeuf du Laboratoire de Pharmacognosie et Biotechnologies de l'Université d'Auvergne (Cedex, France), la vérapamil, le bis-benzimide (Hoechst 33342), la vinblastine, la colchicine, l'umbellifère, l'esculetin, l'esculin, l'angelicin, le psoralen, la Rhodamine-123 (R123) et les autres réactifs proviennent de chez Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Ontario, Canada).

### 3.2 Méthodes

#### 3.2.1 Culture cellulaire

Les cellules rénales Cos-7 de singe vert d'Afrique transformées par le virus simiens SV40 proviennent de chez *American Tissue Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA). Ces cellules ont été cultivées en monocouche dans le milieu de culture DMEM-hg (*Dubelco's Modified Eagle Medium with high glucose*) de chez Gibco BRL (Paisley, Écosse) contenant 1 mM de pyruvate de sodium et 10% de sérum BSC. Les cellules rénales canines Madin-Darby transfectées avec le gène humain MDR1 (MDCK-MDR1) sont une gracieuseté de Amanda Yancy (*AstraZeneca Pharmaceuticals*; Newark, USA). Les cellules MDCK-MDR1 ont été choisis comme témoins positifs de l'expression et de l'activité de transport de la P-gp humaine, car ces dernières expriment fortement une P-gp humaine active par rapport aux cellules MDCK non transfectées (aucune détection en immunobuvardage de type Western, fig. 3.1, fig.4.5, en analyse au FACS, fig. 4.7 et en immunocytochimie, fig. 4.8). Les cellules MDCK-MDR1 ont été cultivées en monocouche dans le milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum FBS inactivé. Tel que décrit au chapitre 2, section 2.5 et 2.6, pour poursuivre l'étude de l'effet de l'interaction physique entre la P-gp et la cavéoline-1 sur l'expression et les activités de transport de la P-gp nous avons surexprimés chez les cellules Cos-7, la P-gp humaine de type sauvage (MDR1) et deux P-gp humaines mutées au site de liaison à la cav-1, YWAA et F37A (Jodoin et al., 2003, tableau 2.1). Les cellules Cos-7 transfectées avec le gène MDR1 et MDR1 mutés ont été maintenues dans le milieu de croissance approprié décrit dans la prochaine section. Toutes les cellules énumérées furent maintenues à 37°C dans une atmosphère à humidité contrôlée en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.2 Transfert de gène et sélection

Les plasmides pCI-neo-MDR1 et MDR1 mutés ont été transfectés chez les cellules Cos-7 à l'aide de l'ensemble de transfection FuGene 6 de chez *Roche Diagnostics* (Montréal,

Québec, Canada). Brièvement, les cellules Cos-7 ont étéensemencées à  $1,0 \times 10^5$  cellules par puits dans une plaque à six puits ou à  $6,0 \times 10^5$  cellules par pètri de 100 mm et cultivées à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures ou jusqu'à une confluence cellulaire de 50%. Par la suite, les cellules ont été transitoirement transfectées dans un milieu exempt de sérum dans une proportion de 1 µg d'ADNc pour 3 µl du réactif FuGene 6 ou 5 µg d'ADNc pour 15 µl de FuGene 6 pour les pètris de 100 mm et incubées durant 5 heures. Suite à l'incubation post-transfection, le milieu de culture a été remplacé par un milieu complet et les cellules furent incubées de nouveau durant 48 heures avant d'effectuer les différentes expérimentations; le photomarquage à la dz-CsA, les analyses d'immunobuvardage ainsi que les essais d'immunofluorescence. Pour la sélection clonale, les cellules Cos-7 transitoirement transfectées MDR1 et MDR1 mutés furent sélectionnées 24 heures post-transfection dans un milieu de culture complet contenant 1,5 mg/ml de généticine et 10 ng/ml de colchicine durant 10 jours. Les populations cellulaires résistantes ont ensuite été propagées dans un milieu complet contenant 1,0 mg/ml de généticine pour les essais d'activité de transport de la P-gp ainsi que les essais de prolifération cellulaire. Certains lots cellulaires de cellules Cos-7 résistantes à la généticine ont été congelés à -80°C dans un milieu complet supplémenté de 20% de sérum BSC et 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) pour des expérimentations subséquentes. Toutes les transfections cellulaires ont été faites en présence du vecteur pCI-neo seul et/ou les cellules Cos-7 parentales en présence de FuGene 6 sans ADNc. Le taux moyen de transfection, évalué avec la protéine fluorescente verte (GFP), est d'environ 23%.

### 3.2.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunodétection

Les cellules Cos-7 transfectées ou non et les cellules MDCK-MDR1 ont été homogénéisées dans du tampon de lyse (1% de Triton X-100, 0,5% de NP-40, 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 10 mM de Tris pH 7,5 et 2% de N-octylglucoside) et centrifugées à 11 500 g durant 10 minutes à 4°C pour enlever les débris cellulaires, suivie d'une quantification des protéines par la méthode du micro-BCA. Par la suite, 10 µg de protéines ont été resuspendus dans le tampon d'électrophorèse Laemmli, 1970 (62,5 mM de Tris/HCl à pH 6,8, 10% de glycérol, 2% de sodium dodécylsulfate (SDS), 5% de β-mercaptoéthanol et



0,01% de bleu de bromophénol) et agité durant 15 minutes pour l'immunodétection de la P-gp humaine ou chauffés durant 4 minutes à 95°C pour l'immunodétection de la cavéoline-1. Par la suite, les échantillons furent déposés sur un gel de polyacrylamide de 7,5% pour la P-gp et 12,5% pour la cavéoline-1. La séparation des protéines fut effectuée selon la technique du sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) de Laemmli, 1970 sur les appareils *Mini-Protean II* de Bio-Rad (San Francisco, CA, USA). Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été transférées (transfert semi-sec) sur des membranes de *PolyVinylidene DiFluoride* (PVDF) de 0,45  $\mu\text{m}$  de mesh à 1  $\text{mA}/\text{cm}^2$  durant 90 minutes en présence de tampon de transfert (96 mM de glycine, 10 mM de Tris et 10% de méthanol) avec les appareils *Milliblot-Graphite Electroblotter I* de Millipore (Mississauga, Ontario, Canada). Les membranes de PVDF ont été incubées, par la suite, dans une solution Blotto constituée de Tris Balance Solution (TBS) et de 5% de lait écrémé (TBS; 50 mM de Tris et 150 mM de NaCl à pH 7,0) durant 1 heure à température pièce ou toute la nuit à 4°C pour bloquer les sites possibles de réaction croisée non spécifique.

L'immunodétection des protéines d'intérêts par la méthode d'immunobuvardage de type Western a été effectuée avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la P-gp (clone C219 à 1/500) et contre la cavéoline-1 (clone 2297 à 1/5000) dans une solution de TBS-Tween à 0,3%, 1% d'albumine sérique bovine (BSA) et 0,02% de sodium azide, durant 2 heures avec agitation constante. Il est à noter, que les membranes de PVDF furent redétestées de nouveau contre une protéine du cytosquelette, la  $\beta$ -actine, pour s'assurer d'une présence constante et homogène des protéines entre les différents échantillons. Par la suite, un IgG anti-souris (1/2500) conjugué à la HRP a été utilisé comme anticorps secondaire dans une solution de TBS-Tween à 0,3% où les membranes ont été incubées durant une heure à température pièce sous une agitation constante. La membrane de PVDF est par la suite mise en contact avec un milieu d'ECL (*enhanced chemiluminescence*) contenant du luminol, du 4-iodophénol et de l'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La HRP conjugué à l'IgG anti-souris fabriquera des radicaux libres à partir de l'eau oxygénée. Ceux-ci sont très efficacement captés puis transmis au luminol qui est alors oxydé en un composé sous son état excité, qui émettra alors des photons lors de sa désactivation. Les photons émis sont alors détectés par un film photographique (autoradiographie).

### 3.2.4 Photomarquage de la P-gp avec la dz-CsA (diazirine-cyclosporine A)

Après 48 heures de post-transfection, les cellules Cos-7 transfectées transitoirement sont récoltées dans une solution de PBS-citrate (138 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,47 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et 15,0 mM de Na-citrate à pH 7,4). Le culot cellulaire est resuspendu dans 10 mM de Tris-HCl à pH 7,5. Selon la méthode de Bradford, une quantité de 100  $\mu\text{g}$  de protéines a été incubée dans 10 mM de Tris-HCl à pH 7,5 durant 50 minutes à 25°C dans le noir avec 0,1% de DMSO (témoin) et/ou 50  $\mu\text{M}$  de vérapamil en présence de 100 nM de dz-CsA ou en concentration croissante de 0 à 500 nM de dz-CsA. Pour le premier volet (effets des coumarins) une quantité de 50  $\mu\text{g}$  de protéines membranaires (isolement des membranes, Demeule *et al.*, 1999) a été co-incubée dans 10 mM de Tris-HCl à pH 7,5 durant 50 minutes à 25°C dans le noir avec 0,1% de DMSO (témoin) et/ou 10  $\mu\text{M}$  de vérapamil et/ou 100  $\mu\text{M}$  de coumarins en présence de 100 nM de dz-CsA ou en concentration croissante de 0 à 100 nM de dz-CsA. Par la suite, tous les échantillons furent incubés sous une lumière ultraviolette (UV) suivie d'une séparation protéique sur gel de polyacrylamide.

La figure 3.1 représente le principe général de la technique du photomarquage où la dz-CsA est réticulée de façon covalente à son site de liaison sur la P-gp sous la lumière UV (Stratalinker UV 2400 de Stratagene, La Jolla, CA, USA) à 254 nm durant 13 minutes à 4°C (Demeule, Wenger et Béliveau, 1997) ou durant 5 minutes à 4°C (premier volet, effets des coumarins). Par la suite, du tampon d'électrophorèse Laemmli a été ajouté aux échantillons et les protéines furent séparées selon la technique SDS-PAGE sur gel de 7,5% d'acrylamide-bisacrylamide (29,2 : 0,8) ou de 6,25% (premier volet ; effet des coumarins).

La dz-CsA liée à la P-gp a été immunodétectée selon la méthode d'immunobuvardage de type Western avec un anticorps monoclonal (1/1000 ou 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dirigé contre la CsA. Les membranes de PVDF ont été incubées durant 2 heures à température pièce suivie par trois lavages au TBS-Tween à 0,3% de 15 minutes chaque sous agitation. Les lavages, l'anticorps secondaire utilisé et le réactif de révélation de l'immunodétection sont les mêmes que décrit dans la section 3.2.3.

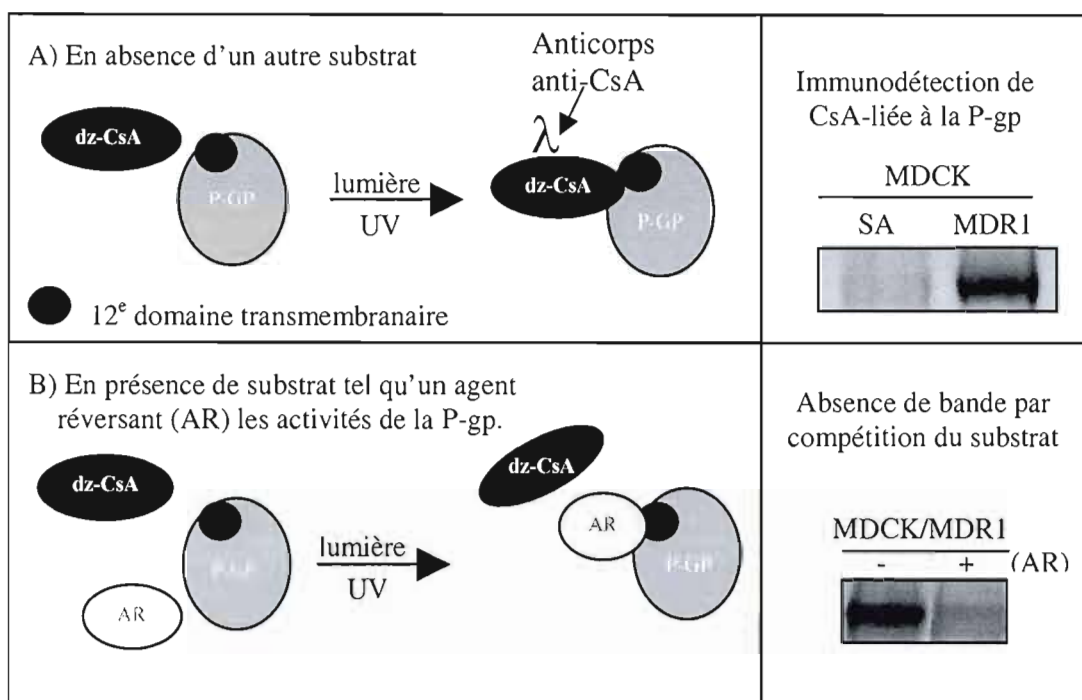


Figure 3.1 : Principe général de la technique du photomarquage de la P-gp à la dz-CsA. A) Lorsque la dz-CsA est le seul substrat présent, celle-ci sera réticulée sous la lumière UV à son site de liaison sur la P-gp et lors de l'immunodétection de la CsA, une bande intense apparaît au poids moléculaire de la P-gp (170 kDa), représentant la CsA liée à la P-gp. B) Lorsqu'elle est utilisée en présence d'un autre substrat de la P-gp, il y a compétition pour le site de liaison sur la P-gp et lors de l'immunodétection de la CsA il y aura absence ou diminution de la bande CsA liée à la P-gp.

### 3.2.5 Immunofluorescence par FACS (cytométrie de flux)

Pour ce faire, nous avons premièrement évalué chez les témoins cellulaires positifs et négatifs (MDCK et MDCK-MDR1) la technique d'immunofluorescence la plus appropriée entre l'immunofluorescence directe et indirecte. La technique directe implique l'utilisation d'un seul type d'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine d'intérêt. Cet anticorps est conjugué à une molécule fluorescente qui une fois excitée réémet une lumière qui sera quantifiée par le cytomètre de flux. La technique indirecte utilise aussi un anticorps monoclonal dirigée contre la protéine d'intérêt mais c'est un deuxième anticorps dirigé contre

le premier anticorps qui est conjugué à une molécule fluorescente qui excitée réémettra une lumière quantifiable. La technique directe permet une détection de faible à moyenne intensité avec peu de réactions non spécifiques, tandis que la technique indirecte assure une détection forte mais un risque beaucoup plus élevé de réactions non spécifiques.

Pour ce faire, un nombre de  $1,0 \times 10^6$  cellules témoins ont été resuspendu dans 100  $\mu$ l de tampon de liaison (1mM d'HEPES, 140 mM de NaCl, 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  à pH 7,4, supplémenté avec 1% de sérum de veau fœtal) et incubé durant 1 heure à 4°C avec 10  $\mu$ g/ml d'anticorps monoclonaux reconnaissant un épitope extracellulaire chez la P-gp humaine. Ces anticorps sont, soit 20  $\mu$ l (10  $\mu$ g/ml) du clone 17F9 de souris IgG<sub>2b</sub>,  $\kappa$  conjugué au FITC avec son témoin l'immunoglobuline de souris IgG<sub>2b</sub>,  $\kappa$  conjugué au FITC, pour la technique directe ou 5  $\mu$ l (10  $\mu$ g/ml) du clone murin MM4.17 IgG<sub>2a</sub> et son témoin 5  $\mu$ l de tampon de liaison, pour la technique indirecte. Une fois le temps d'incubation écoulé, trois lavages furent effectués, suivie d'une resuspension dans 1 ml de tampon de liaison. Pour la technique indirecte, une autre incubation de 45 minutes à 4°C avec 1  $\mu$ l d'IgG<sub>2A</sub> de chèvre anti-souris d'Alexa-Fluor fut complétée, suivie de trois lavages supplémentaires. Par la suite, les cellules témoins des deux techniques ont été resuspendues dans 1 ml de tampon de liaison et la fluorescence associée à 10 000 cellules a été mesurée au FACSCAN cytomètre de flux de BD FACS Calibur, Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA). Les résultats obtenus furent analysés avec le logiciel *CellQuest Pro software* (Becton Dickinson).

Par la suite, le protocole utilisé pour l'immunofluorescence indirecte est le suivant : les cellules Cos-7 transfectées transitoirement avec les plasmides pCI-neo-MDR1, MDR1 mutés, pCI-neo-vecteur ou non transfectées et les cellules MDCK-MDR1 (témoin positif) ont été récoltées avec du PBS-citrate et  $1,0 \times 10^6$  cellules ont été resuspendues dans 100  $\mu$ l de tampon de liaison. Pour déterminer l'expression à la surface cellulaire des P-gp transfectées ou non, les cellules furent incubées durant 1 heure à 4°C avec 1  $\mu$ l de MM4.17, un anticorps murin monoclonal (1 :100) dirigé contre un épitope linéaire continu de la partie apicale de la quatrième boucle de la P-gp humaine. Par la suite, les cellules furent lavées trois fois et resuspendues dans 1 ml de tampon de liaison, suivie d'une incubation de 45 minutes à 4°C avec 1  $\mu$ l d'IgG<sub>2A</sub> de chèvre anti-souris d'Alexa-Fluor ou comme témoin dans un échantillon cellulaire ne contenant pas l'anticorps MM4.17. Après trois lavages supplémentaires, les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de tampon de liaison et la fluorescence associée à 10

000 cellules à été mesurée au FACSCAN. Les résultats obtenus furent analysés avec le logiciel *CellQuest Pro software*.

#### 3.2.5.1 Immunocytochimie par microscopie à fluorescence

En parallèle aux essais d'immunofluorescence au FACS, la technique d'immunocytochimie a été appliquée chez 3000 cellules MDCK et MDCK-MDR1 déposées sur des lamelles acidifiées. Ces lamelles ont été incubées durant 24 heures dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum FBS inactivé et maintenues à 37°C dans une atmosphère à humidité contrôlée en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Les lamelles contenant les cellules ont été lavées 3 fois avec du tampon PBS à 4°C pour être ensuite fixées dans une solution de paraformaldéhyde 2% (V/V) durant 10 minutes à 4°C, suivie de trois lavages au tampon PBS à 4°C. Les lamelles furent par la suite incubées durant 30 minutes à température pièce avec une solution de PBS supplémentée à 0,5% de BSA (PBSA) et leur immunoglobuline témoin respective, section 3.2.5, suivie de trois lavages au PBSA. Les lamelles furent incubées (en noirceur) dans une solution de PBSA contenant leur anticorps monoclonal respectif (10 µg/ml du clone 17F9 de souris IgG<sub>2b</sub>, κ conjugué au FITC et 1 µg/ml du clone murin MM4.17 IgG<sub>2a</sub>) durant une heure à température pièce. Toujours en noirceur, les lamelles furent lavées trois fois 5 minutes avec une solution de PBSA. Les lamelles du marquage direct furent par la suite, toujours en noirceur, rinçées avec une solution tampon de PBS suivie de rinçage à l'eau nanopure et montage des lames pour l'évaluation microscopique avec l'ensemble Prolong antifade de *Molecular Probe*, selon les directives du fabricant. Les lamelles du marquage indirect furent incubées (en noirceur) dans une solution de PBSA contenant l'anticorps secondaire IgG<sub>2A</sub> de chèvre anti-souris d'Alexa-Fluor (1 :1000) durant 30 minutes à température pièce, suivie de trois lavages de 5 min dans une solution de PBSA. Ces mêmes lamelles ont été, par la suite, rinçées avec une solution de PBS suivie de rinçage à l'eau nanopure avant d'être montées pour l'évaluation microscopique.

### 3.2.6 Activités de transport de la P-gp par accumulation intracellulaire

#### 3.2.6.1 Accumulation intracellulaire de bis-benzimide (Hoechst 33342)

Les cellules Cos-7 transfectées et sélectionnées ont étéensemencées à 100 000 cellules par puits dans une plaque à six puits et incubées durant trois jours à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu complet, c'est à dire contenant 1,0 mg/ml de généticine. À confluence les cellules sont lavées deux fois dans du HBSS (1,3 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5,4 mM de KCl, 0,44 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,83 mM of MgSO<sub>4</sub>, 137 mM de NaCl, 4,2 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,34 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 25 mM de D-glucose, pH 6,5) et incubées pour 1 heure à 37°C dans du HBSS contenant 1 µM de substrat fluorescent bis-benzimide (Hoechst 33342), avec 0,1% d'éthanol (témoin) ou 10 µM de CsA. La fluorescence intracellulaire du substrat Hoechst a été suivie en continu avec le spectrofluoromètre SpectraMax Gemini de *Molecular Device* (Sunnyvale, CA, USA) à la longueur d'onde de 355 nm d'excitation et 460 nm d'émission.

#### 3.2.6.2 Accumulation intracellulaire de rhodamine-123 (R-123)

Les cellules MDCK-MDR1 ont étéensemencées à 150 000 cellules par puits dans une plaque à 24 puits et incubées durant quatre jours à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu complet de DMEM supplémenté avec 10% de sérum FBS inactivé. À confluence les cellules sont lavées deux fois dans du HBSS (1,3 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5,4 mM de KCl, 0,44 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,83 mM of MgSO<sub>4</sub>, 137 mM de NaCl, 4,2 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,34 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 25 mM de D-glucose, pH 6,5) à 37°C. Les cellules sont par la suite préincubées pendant 30 minutes à 37°C dans du HBSS contenant ou non 10 ou 100 µM de coumarins : cnidiadin (Cni), l'angelicin (5), le psoralen (4), l'esculin (3), l'esculetin (2), l'umbelliferone (1), en présence d'un témoin à 0,1% de DMSO (V/V). Finalement, 20 µM de R-123 fut ajouté à chaque puits et incubé durant 2 heures à 37°C. L'accumulation de R-123 est arrêtée par cinq lavages consécutifs de PBS froid (150 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,3 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à pH 7,4), suivie d'une lyse cellulaire avec 0,1% de

Triton X-100 à température pièce. La fluorescence des lysats cellulaires a été mesurée avec le spectrofluoromètre SpectraMax Gemini de *Molecular Device* à la longueur d'onde de 485 nm d'excitation et 538 nm d'émission.

### 3.2.7 Prolifération cellulaire

Les cellules Cos-7 transfectées, sélectionnées et non transfectées ont étéensemencées à 3 000 cellules par puits dans une plaque de 96 puits et incubées durant 24 heures ou jusqu'à 70% de confluence dans un milieu complet contenant 1,0 mg/ml de généticine, l'agent de sélection. Les cellules ont été lavées une fois avec du tampon PBS à 37°C et le milieu DMEM-hg supplémenté avec 1% de sérum BCS fut ajouté en présence de vinblastine (10 nM ou de 0 à 100 nM), ou de colchicine (25 nM) ou de Taxol (5 nM ou de 0 à 20 nM) dans 0,2% de DMSO (témoin). Par la suite, les cellules furent incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> durant 72 heures et lavées deux fois avec du tampon PBS. Un milieu complet de DMEM-hg supplémenté avec 10% de sérum BCS et 10% de WST-1 (sel de tétrazolium réduit par les cellules vivantes : la déhydrogénase mitochondriale, pour former un colorant soluble de type formazan) a été ajouté dans chaque puits et incubé à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> durant 2 heures. L'essai colorimétrique de la survie cellulaire fut enregistré avec l'appareil Elisa à 540nm et analysé avec le logiciel SoftMax Pro. Les essais de prolifération cellulaire chez les cellules MDCK-MDR1 pour le premier volet (effets des coumarins) sont sensiblement le même que celui décrit précédemment. Les cellules MDCK-MDR1 furentensemencées à 5 000 cellules par puits dans une plaque de 96 puits, le lendemain, 0,6 µM de vinblastine en présence ou non de 10 µM de cnidiadin, fut ajoutée et incubée durant 72 heures à 37°C, la suite du protocole expérimental est le même que décrit plus haut.

### 3.2.8 Analyses densitométrique et statistique

Toute les expérimentations ont été effectuées au moins trois fois dans des cellules de culture séparée. L'analyse de l'intensité des bandes obtenues en immunodétection et en

photomarquage ont été évaluées avec le densitomètre personnel SI de *Molecular Dynamics* (Sunnyvale, CA, USA) ou le logiciel de densitométrie au laser *IP labGel*. Les essais d'immunofluorescence en cytométrie de flux ont été analysés avec le logiciel *CellQuest Pro software*. Les essais colorimétriques en prolifération cellulaire ont été analysés avec le logiciel *SoftMax Pro*. Les résultats obtenus sont exprimés en tant que la moyenne  $\pm$  l'écart type et l'analyse statistique utilisée est le *t*-test de Student où  $p < 0,05$  est considéré significatif.



## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS

#### 4.1 et 4.2 Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp chez les cellules MDCK

Dans le premier volet, nous avons vérifié si le cnidiadin pouvait interagir compétitivement avec la P-gp. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique du photomarquage de la P-gp à la diazirine-CsA. Cette dernière est un dérivé photoactivable de la CsA qui possède un groupement diazirine à la position 8 ainsi qu'une grande affinité pour la P-gp (Demeule, Wenger et Béliveau, 1997) (voir la section 3.2.4 et la figure 3.1 pour le principe général du photomarquage de la P-gp à la dz-CsA). Les photomarquages furent effectués avec des aliquots de membrane cellulaire MDCK-MDR1 co-incubés avec la dz-CsA en présence de cnidiadin. La quantité de P-gp marquée à la dz-CsA fut déterminée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps monoclonal dirigée contre la CsA où le niveau de P-gp marquée fut quantifié en densitométrie. Les concentrations utilisées entre 0 et 100  $\mu\text{M}$  de cnidiadin inhibent de façon concentration dépendante le photomarquage de la P-gp par la dz-CsA (fig. 4.1). Aux concentrations de 25  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  de cnidiadin, l'inhibition atteint environ 65% et 75%, respectivement (fig. 4.1). Par contre, l'inhibition du photomarquage à 25  $\mu\text{M}$  de cnidiadin (65%) est l'équivalent de l'inhibition induite par 10  $\mu\text{M}$  de vérapamil (66%) (fig. 4.2). Cependant à 100  $\mu\text{M}$ , tous les coumarins inhibent le photomarquage de la P-gp par la dz-CsA. Le cnidiadin semble être le coumarin qui compétitionne le plus efficacement la dz-CsA pour la liaison à la P-gp (fig. 4.2). En effet, le plus haut degré d'inhibition par les coumarins autre que le cnidiadin est de 34% pour l'angelicin et le psoralen à 100  $\mu\text{M}$  (fig. 4.2), ce qui est plus faible que l'inhibition induite par le cnidiadin à 10  $\mu\text{M}$  (45%) (fig.4.1). L'ordre de grandeur de l'inhibition du photomarquage de la P-gp est : cnidiadin >>> angelicin  $\cong$  psoralen > umbelliferone, esculin et esculetin.

#### 4.3 Augmentation de l'accumulation intracellulaire de R-123 par le cnidiadin chez les cellules MDCK-MDR1

Tel que décrit à la section 4.1 et 4.2, tous les 6 coumarins étudiés ici peuvent inhiber le photomarquage à la dz-CsA de la P-gp, mais seul le cnidiadin compétitionne efficacement la dz-CsA pour la liaison à la P-gp. Nous avons donc poursuivi l'exploration de la capacité potentielle des coumarins à inhiber l'activité de transport de la P-gp. Pour ce faire, nous avons examiné si le cnidiadin et les autres coumarins testés pouvaient affecter l'accumulation intracellulaire de la R-123, un substrat fluorescent couramment utilisé lors des investigations expérimentales des activités de transport des inhibiteurs potentiels de la P-gp. Dans une première série d'expérimentations, tous les coumarins furent analysés aux concentrations de 10 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au témoin (DMSO à 0,1%) (fig. 4.3 a). Une augmentation intracellulaire du colorant fluorescent (R-123), d'environ 9 fois supérieure au témoin, a été observée chez les cellules MDCK-MDR1 traitées avec 100  $\mu\text{M}$  de cnidiadin, tandis qu'aucune accumulation intracellulaire significative ne fut détectée avec les autres coumarins à 100  $\mu\text{M}$  ou par le cnidiadin à 10  $\mu\text{M}$  (fig. 4.3 a). Le potentiel d'inhibition des activités de transport de la P-gp a été par la suite mesuré en relation avec des témoins positifs : 10  $\mu\text{M}$  de CsA et 50  $\mu\text{M}$  de vérapamil. Ces témoins positifs ont provoqué une accumulation intracellulaire de R-123 d'environ 7 fois et 5 fois, respectivement, par rapport au témoin négatif, tandis que 100  $\mu\text{M}$  de cnidiadin a provoqué une accumulation intracellulaire d'environ 9 fois (fig. 4.3 b). En résumé, à 10  $\mu\text{M}$ , le cnidiadin n'a pas induit une accumulation significative de la R-123, mais inhibe le photomarquage à la dz-CsA d'environ 45%. Tandis que les autres coumarins à 100  $\mu\text{M}$  ont été incapables d'induire une accumulation de la R-123 et inhibent peu le photomarquage à la dz-CsA (< que 34%) en comparaison avec le cnidiadin qui à 100  $\mu\text{M}$  augmente de 9 fois l'accumulation intracellulaire de R-123 et inhibe le photomarquage à plus de 75%. Le cnidiadin semble posséder une structure conformationnelle et chimique qui lui confère, par rapport aux autres coumarins analysés, une affinité grandement supérieure envers la P-gp.

#### 4.4 Augmentation de la toxicité cellulaire de la vinblastine par le cnidiadin

Malgré que la R-123 soit un substrat de la P-gp on ne peut utiliser ce modèle pour explorer le potentiel du cnidiadin en tant qu'agent réversant. L'équipe du Dr Barthomeuf a complété des essais d'activité de transport de la vinblastine tritiée ( $[^3\text{H}]$ -VBL) chez les cellules MDCK-MDR1 en présence de 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  des 6 coumarins étudiés (Barthomeuf *et al.*, 2005, appendice A). Ces résultats démontrent que le cnidiadin est le seul des coumarins testés à exhiber un potentiel d'agent chimiosensibilisant (Barthomeuf *et al.*, 2005, appendice A). Dans ce contexte, des expérimentations furent effectuées pour vérifier si des cotraitements avec le cnidiadin pourraient augmenter la cytotoxicité de la vinblastine chez les cellules résistantes et surexprimant la P-gp humaine (MDCK-MDR1).

Pour ces expérimentations, la vinblastine et la cnidiadin furent utilisées à une concentration qui inhibe environ 50% de la survie cellulaire, la  $\text{IC}_{50}$ , soit 0,6  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$ , respectivement (Barthomeuf *et al.*, 2005, appendice A). La cytotoxicité a été évaluée après plusieurs expositions de 72 heures, soit à la vinblastine, soit au cnidiadin ou à la combinaison des deux composés. Le niveau de résistance des cellules MDCK-MDR1 à la vinblastine est d'environ 14. Cette valeur est évaluée en tant que la  $\text{IC}_{50}$  de la vinblastine chez les cellules MDCK-MDR1 divisée par celle de la lignée parentale, les MDCK de type sauvage (0,04  $\mu\text{M}$ ) (Barthomeuf *et al.*, 2005, appendice A). Lorsque les cellules MDCK-MDR1 sont exposées à 0,6  $\mu\text{M}$  de vinblastine, la toxicité cellulaire est de 57% et cette proportion de mort cellulaire atteint les 93% lorsque la vinblastine est appliquée en association avec 10  $\mu\text{M}$  de cnidiadin (fig. 4.4). Par contre, le traitement avec 10  $\mu\text{M}$  de cnidiadin élimine la moitié de la population cellulaire (fig.4.4). À cause de cette cytotoxicité, il est impossible de préciser à la lumière de ces résultats, si l'effet bénéfique du cnidiadin est le résultat d'une cytotoxicité additive ou d'un effet réversant ou les deux. Toutefois, 10  $\mu\text{M}$  de cnidiadin augmente la toxicité cellulaire de la vinblastine chez les cellules MDCK-MDR1 de 163%.

#### 4.5 - 4.6 Expression cellulaire des P-gp transfectées transitoirement

Dans le deuxième volet, nous avons premièrement évalué le niveau d'expression des P-gp transitoirement transfectées chez les cellules Cos-7 par immunobuvardage de type Western avec l'anticorps monoclonal C-219 et comparer leur niveau d'expression avec les cellules MDCK-MDR1 stablement transfectées. L'immunodétection de la P-gp chez les cellules Cos-7 transitoirement transfectées avec l'ADNc MDR1 est effectuée 48 heures post-transfection. La protéine MDR1 humaine dans les deux systèmes cellulaires utilisés est bien exprimée par une bande intense de 170 kDa comparée aux lignées parentales respectives, nommée SA pour le type sauvage, c'est à dire la lignée parentale non transfectée, MDCK-SA (fig. 4.5a). L'immunodétection des cellules Cos-7 transfectées transitoirement avec la P-gp (MDR1) et les P-gp mutées, YWAA et F37A, montre une expression cellulaire similaire entre les protéines MDR1 et MDR1 mutées (fig. 4.5b et c). Pour s'assurer qu'il y ait une quantité égale de protéines analysée entre chaque échantillon, nous avons redéetecté en immunodétection la  $\beta$ -actine (fig. 4.5c).

Nous avons aussi analysé l'expression de la protéine MDR1 transfectée chez les cellules Cos-7 par photomarquage à la dz-CsA (Demeule, Wenger et Béliveau, 1997) et comparer le marquage avec la lignée cellulaire MDCK-MDR1. De plus, la spécificité du photomarquage à la dz-CsA a été analysée (fig. 4.6a). Par la suite, nous avons vérifié si les mutations induites au motif de liaison à la cavéoline-1 sur la P-gp, YWAA et F37A, provoqueraient une non reconnaissance ou une reconnaissance partielle du site de liaison du substrat à la P-gp. Pour ce faire, le photomarquage de la P-gp à la dz-CsA a été effectué en présence d'un substrat connu de la P-gp, la vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques. En conséquence, le photomarquage spécifique de la P-gp humaine par 100 nM de dz-CsA fut compétitivement inhibé par 50  $\mu$ M de vérapamil, suggérant l'expression de P-gp humaines mutées ou non sous une forme active et reconnue par ses substrats (fig. 4.6b).

#### 4.7 - 4.9 Localisation à la surface cellulaire des P-gp transfectées transitoirement

Les P-gp humaines transfectées chez les cellules Cos-7 sont exprimées sous une forme active, reconnaissance des protéines MDR1 mutées ou non par ses substrats, et à un niveau cellulaire similaire. Avant de poursuivre l'étude sur la localisation cellulaire des P-gp transfectées, nous avons effectué des essais d'immunofluorescence directe et indirecte sur les cellules témoins, MDCK et MDCK-MDR1. L'anticorps conjugué, clone 17F9, pour la technique d'immunofluorescence directe et l'anticorps non conjugué, clone MM4.17, pour la technique indirecte. Ces deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre des épitopes extracellulaires différents de la P-gp humaine. L'objectif de ces essais est d'évaluer la technique offrant la meilleure détection de la P-gp exprimée au niveau des membranes avec un minimum de réactions non spécifiques. Les résultats obtenus démontrent une détection de la P-gp membranaire entre les cellules MDCK et MDCK-MDR1 de 4,7 fois pour la technique directe par rapport à 22,2 fois pour la technique indirecte (fig. 4.7 a et b). Lorsque le facteur de concentration des anticorps (clone MM4.17 de 1,0  $\mu\text{g/ml}$  et clone 17F9 de 10  $\mu\text{g/ml}$ ) est tenue en considération, l'amplification du signal avec la technique indirecte est de 222 fois. Finalement, la puissance de la technique d'immunofluorescence indirecte est d'environ 50 fois supérieure ( $222/4,7$ ) à la technique directe, et ceci malgré une légère réaction non spécifique de son IgG<sub>2A</sub> conjugué Alexa-Fluor (fig. 4.7 a, clone MM4.17). Nous avons aussi exploré la technique d'immunocytochimie de la P-gp humaine par microscopie à fluorescence chez les cellules témoins, MDCK et MDCK-MDR1, avec les mêmes anticorps et concentrations utilisés pour les techniques de fluorescence au FACS (fig. 4.8). Les résultats obtenus montrent la présence de la P-gp aux membranes (fig. 4.8), de plus, ces essais démontrent aussi la spécificité de ces anticorps pour la P-gp humaine, car les cellules MDCK expriment une P-gp d'origine canine par rapport aux cellules MDCK-MDR1 stablement transfectées avec la P-gp humaine (fig. 4.7 et 4.8).

Nous avons donc poursuivi l'étude en immunofluorescence indirecte analysée au FACS dans le but de quantifier l'expression des P-gp transfectées transitoirement à la surface des cellules Cos-7. L'anticorps utilisé, le MM4.17, reconnaît un épitope linéaire continu sur la partie apicale de la quatrième boucle de la P-gp. La figure 4.9 représente une expérimentation indépendante de trois analyses en immunofluorescence au FACS. Les témoins négatifs, tels

que les immunoglobulines (IgGs), les cellules Cos-7 non transfectées et transfectées avec le vecteur seul et couplés au fluorochrome Alexa-Fluor, sont représentés à la gauche du graphique (fig. 4.9 a) en comparaison avec les trois pics obtenus chez les cellules Cos-7 transfectées avec la P-gp humaine mutée ou non à son motif de liaison à la cavéoline-1 (MDR1, YWAA et F37A). Les fluorescences relatives enregistrées sont augmentées en moyenne plus de 70 fois par rapport aux cellules Cos-7 non transfectées ou transfectées avec le vecteur seul et le niveau d'expression à la surface cellulaire des P-gp transfectées entre les aliquots MDR1, YWAA et F37A est similaire (fig. 4.9 b). Les résultats obtenus montrent que les P-gp humaines mutées ou non et transfectées transitoirement chez les cellules Cos-7 sont exprimées et localisées à la surface cellulaire à des niveaux similaires.

#### 4.10 Activité de liaison supérieure chez les P-gp mutées et transfectées transitoirement

Nous avons, par la suite, évalué l'activité de liaison du substrat des P-gp transfectées chez les cellules Cos-7 par photomarquage à la dz-CsA. Nous avons premièrement réticulé la dz-CsA à la P-gp sous la lumière UV, jusqu'à saturation (0 à 500 nM) suivie d'une immunodétection de la P-gp marquée à la CsA (fig. 4.10 a). Lors du traitement en densitométrie des bandes obtenues, le graphique de liaison maximale de la dz-CsA à la P-gp, montre un marquage plus intense entre les mutants de la P-gp, YWAA et F37A, en comparaison à la P-gp non mutée, MDR1 (fig. 4.10 b). En effet, les courbes obtenues et analysées avec le logiciel SoftMax Pro, montrent des maximums de liaison (B max) de 0,81 pour YWAA et 0,86 pour F37A en comparaison avec 0,71 pour MDR1. Ces résultats suggèrent une activité significative de liaison de substrat plus active pour les P-gp mutées au motif de liaison à la cavéoline-1 sur la P-gp. En conséquence, une moindre interaction entre la P-gp et la cavéoline-1, due aux mutations au niveau du motif de liaison à la cavéoline-1, augmente significativement l'activité de liaison de la dz-CsA à la P-gp.

#### 4.11-4.12 Sélection clonale, optimisation et expression de la P-gp chez les sélectants

Les mutations au motif de liaison de la cavéoline-1 sur la P-gp influent à la hausse l'activité de liaison du substrat. Nous avons donc poursuivi l'étude sur les impacts fonctionnels de cette diminution d'interaction entre la cavéoline-1 et la P-gp sur les activités de transport de la P-gp. Pour ce faire, nous avons transfecté les cellules Cos-7 avec les plasmides pCI-neo-MDR1, pCI-neo-YWAA, pCI-neo-F37A. Les témoins sont le plasmide pCI-neo-vecteur ainsi que des cellules Cos-7 non transfectées et exposées ou non aux mêmes conditions de culture suite à la sélection clonale. Les transfectants furent cultivés et sélectionnés dans un milieu de culture contenant 5,0 mg/ml de l'antibiotique de sélection, la généticine (G-418, inhibiteur de la synthèse protéique), durant 10 jours pour être ensuite propagés dans les mêmes conditions. Les sélectants cellulaires obtenus ont été analysés en immunodétection de type Western envers la P-gp et du premier passage cellulaire au 8<sup>e</sup>, l'expression de la P-gp est perdue (fig. 4.11 a).

En effet, suite à quelques recherches, nous avons découvert que l'ADN de la protéine MDR1 possède un site cryptique interne de clivage dans le contexte des vecteurs rétroviraux (Kane *et al.*, 2001). De plus, la généticine n'offre pas un niveau élevé de sélection rigoureuse du système MDR1, qui lui nécessite généralement une haute expression de P-gp pour survivre à certaines expositions, telles que la colchicine ou le Taxol (Kane *et al.*, 2001). En conséquence, dans le temps il y aura de moins en moins de P-gp fonctionnelle exprimée par les sélectants (fig. 4.11 a). En effet, l'équipe du Dr Kane, a démontré que les sélectants à la colchicine démontrent de haut niveau d'ARNm mono et bicistronique pleine longueur versus les sélectants à la G-418, 50% d'ARNm tronqué, donc de P-gp non fonctionnelle (Kane *et al.*, 2001). Toutefois, cette équipe a aussi démontré que le faible niveau d'expression de la P-gp chez des sélectants à la G-418 est la réflexion du niveau d'ARNm et non du splicing pour éliminer la séquence codante MDR1. Donc, des sélectants à la colchicine dérivent du même clone de départ (reproductibilité), tandis que des sélectants à la G-418 vont dériver de différents clones de départ, induisant des variances dans la reproductibilité dû à des taux variés d'ARNm pleine longueur (Kane *et al.*, 2001). De plus, lorsque l'on expose des cellules à la colchicine ou au Taxol, entre autres, l'expression de la P-gp est en fonction de la résistance qu'auront ces cellules envers ces composés. Contrairement à ce qui a été démontré,

il n'y a aucune relation entre l'expression de la protéine néomycine phosphotransférase et la résistance à la G-418 (Kane *et al.*, 2001). En d'autres mots, la G-418 n'amplifie pas l'expression génique MDR1 en fonction de l'augmentation de la concentration de l'agent de sélection comme c'est le cas pour la colchicine, et plus elle est concentrée, plus elle induit des taux variants d'ARNm pleine longueur. Dans ces contextes, nous avons déterminé expérimentalement un ratio adéquat de G-418/colchicine pour induire dans notre système cellulaire 1) une bonne amplification du gène MDR1 en ARNm pleine longueur et fonctionnel (apporté par l'astringence de la colchicine sur le système MDR1), 2) une minimisation d'ARNm tronqués pour diminuer les variances entre les clones (faible concentration de G-418) et 3) favoriser la stabilité du vecteur transfecté dans le temps.

Plusieurs essais d'optimisation de la sélection clonale ont été élaborés, celle qui nous a donné de bons résultats fut d'effectuer la sélection avec 3,3 fois moins de G-418 en présence de 10 ng/ml de colchicine durant 10 jours suivie d'une propagation et maintien dans un milieu de culture ne contenant que 1,0 mg/ml de G-418. Il est important d'éviter la confluence cellulaire, un contact étroit entre les cellules semble induire une résistance à une sélection adéquate de clones reproductibles. Dans ce contexte de sélection et de maintien, l'expression de la protéine MDR1 a été augmenté entre trois fois à six fois avec 2 fois moins de protéines (20  $\mu$ g à 10  $\mu$ g de protéines par puits) et après quelques passages, l'expression est maintenue (fig. 4.11 b). La figure 4.11 c représente l'expression cellulaire de la P-gp chez les sélectants où cette expression est comparée au contrôle négatif, le vecteur seul, et au contrôle positif, les cellules MDCK-MDR1. Il est à noter, qu'à la figure 4.11 c, l'expression de la P-gp diminue, car une fois les cellules transfectées et sélectionnées, le système cellulaire devient instable à plus de 8 à 10 passages cellulaires. Les résultats montrent une grande expression des P-gp transfectées par rapport aux contrôle négatif et ceci à un niveau similaire entre les cellules Cos-7-MDR1, YWAA et F37A, de plus la  $\beta$ -actine a été aussi détectée pour s'assurer qu'il y ait une quantité égale de protéines analysée entre chaque échantillon.

Une fois les sélectants obtenus avec des niveaux d'expression acceptables et similaires entre les P-gp transfectées, ces derniers furent préparés pour l'analyse des activités de transport de la P-gp par accumulation intracellulaire de Hoechst et de prolifération cellulaire où à chaque expérimentation, des aliquots cellulaires furent conservés et analysés en



immunodétection. La figure 4.12 a et b présente des immunodétections de type Western des sélectants Cos-7 où le niveau d'expression de la P-gp est similaire entre les échantillons MDR1, YWAA et F37A et grandement supérieure, soit aux cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur seul, soit aux cellules Cos-7 parentales. La figure 4.12 c résume les différents résultats du ratio MDR/ $\beta$ -actine des immunodétections entreprises avec l'anticorps monoclonal C-219 dirigé contre la P-gp, soit en moyenne : Cos-7 parental 0,51; Cos-7 vecteur 0,60; Cos-7 MDR1 1,18; Cos-7 YWAA 1,16 et Cos-7 F37A 1,29. Il est à noter que le niveau d'expression de la cavéoline-1 chez les sélectants (fig. 4.12 a) en comparaison au niveau d'expression de la cavéoline-1 chez les cellules cos-7 transfectées transitoirement (non présenté dans les résultats) semble être à la hausse (environ 3 fois supérieur), mais lors des différentes analyses densitométriques des bandes obtenues entre les sélectants et les transitoires, cette hausse d'expression de la cavéoline-1 est plutôt une tendance (non significative, d'autres analyses en immunodétection seraient nécessaires).

#### 4.13 Diminution de l'accumulation intracellulaire chez les mutants de la P-gp

Pour élucider si la réduction de l'interaction physique entre la P-gp et la cavéoline-1 due aux mutations présentes au niveau du motif de liaison à la cavéoline-1 sur la P-gp affecte les fonctions de la P-gp, nous avons analysé son activité de transport par accumulation intracellulaire de Hoechst, un substrat fluorescent de la P-gp. La figure 4.13 a montre une diminution de l'accumulation intracellulaire du substrat Hoescht d'environ deux fois (45%) avec les P-gp mutantes au motif de liaison de la cavéoline-1 en comparaison avec la P-gp de type sauvage (MDR1). Ces résultats confirment une activité de transport accrue de la P-gp pour expulser le réactif fluorescent hors de la cellule chez les mutants de la P-gp. De plus, cette activité de transport est inhibée par 10  $\mu$ M de CsA, un agent immunosuppresseur substrat de la P-gp (fig. 4.13 a). Il est à noter que l'inhibition de l'activité de transport de la P-gp par la CsA est supérieure chez le mutant F37A par rapport au mutant YWAA. En effet, le ratio d'inhibition sur l'accumulation intracellulaire (fig. 4.13 b) montre un état de sensibilité envers la CsA un peu plus prononcé chez le mutant F37A de 3,05 fois par rapport à 2,54 fois pour le mutant YWAA. Toutefois, cette sensibilité cellulaire à la CsA est à la hausse

significativement entre les mutants YWAA et F37A par rapport à l'état cellulaire de la P-gp de type sauvage, MDR1; 1,76 par rapport à 2,54 et 3,05. C'est à dire une sensibilité chez le sélectant YWAA d'environ 1,44 fois supérieure au sélectant MDR1 et 1,73 fois pour le sélectant F37A, indiquant une possible résistance supérieure aux médicaments chez les mutants de la P-gp au motif de liaison de la cavéoline-1.

#### 4.14 Survie cellulaire accrue à la colchicine chez les mutants de la P-gp

Pour confirmer d'avantage l'impact fonctionnel de la moindre interaction entre la P-gp et la cavéoline-1, la résistance ou la sensibilité aux médicaments de ces systèmes cellulaires exprimant la P-gp mutée ou non a été évalué par la méthode de prolifération cellulaire en présence de colchicine. La survie cellulaire en présence de 25 nM de colchicine montre une résistance supérieure envers ce perturbateur du cytosquelette d'environ 25% par rapport au système cellulaire exprimant la P-gp non mutée à son motif de liaison à la cavéoline-1 (fig. 4.14 a). L'observation cellulaire microscopique de cette résistance est présentée à la figure 4.14 b. Curieusement, la colchicine utilisée dans cet essai semble avoir le même effet sur les deux mutants, tout comme le réactif Hoechst, ce qui n'est pas le cas de la CsA qui semble avoir un effet plus prononcé sur le mutant F37A (sensibilité à la CsA un peu plus élevée).

#### 4.15 Survie cellulaire accrue à la vinblastine et au Taxol chez les mutants de la P-gp

Nous avons poursuivi l'étude de l'impact fonctionnel sur les activités de transport de la P-gp avec deux autres agents chimiothérapeutiques connus, la vinblastine et le Taxol. La figure 4.15 a présente une augmentation de la survie cellulaire en présence de 10 nM de vinblastine chez les mutants de la P-gp d'environ 20% chez YWAA et 30% chez F37A par rapport à la P-gp de type sauvage, MDR1. Tandis que la survie cellulaire en présence de 5 nM de taxol chez les mutants (YWAA et F37A) de la P-gp est augmentée de 20%, toujours en relation avec la P-gp humaine de type sauvage (MDR1). Les mutations au motif de liaison de la cavéoline-1 sur la P-gp favorisent une plus grande activité de liaison au substrat et une

plus grande activité de transport de la P-gp. Par contre, ces activités sont plus élevées avec le simple mutant F37A que le double mutant YWAA envers les composés, CsA et vinblastine (sensibilité de 3,05 versus 2,54 à la CsA et survie cellulaire à la vinblastine de 30% versus 20%). Contrairement à une activité de transport similaire entre les deux mutants pour le substrat Hoechst (augmentation de l'efflux de 45%), la colchicine et le Taxol (augmentation de la survie cellulaire de 20%).

#### 4.16 Augmentation de la résistance multiple chez les mutants de la P-gp

Par la suite, des courbes de survie ont été obtenues lors d'expérimentations en prolifération cellulaire en présence de vinblastine de 0 à 100 nM et de Taxol de 0 à 20 nM où les  $IC_{50}$  en fonction des types cellulaires utilisés ont été compilées (tableau 4.16.1). Il est à noter que les concentrations inhibitrices envers 50% de la population cellulaire, les  $IC_{50}$ , ont été analysé avec le logiciel Soft Max Pro et le niveau de résistance a été calculé comme étant la  $IC_{50}$  des cellules résistantes, YWAA et F37A, divisée par la  $IC_{50}$  de la lignée cellulaire de type sauvage, MDR1. En conséquence, les analyses en survie cellulaire montrent un niveau de résistance de 1,7 et 2,2 fois supérieur pour la vinblastine et 2,8 et 2,4 fois supérieur pour le Taxol chez les cellules exprimant les P-gp mutées (YWAA et F37A, respectivement) par rapport à la P-gp non mutée (MDR1) (tableau 4.16.1). La MDR a doublée, en moyenne, chez les mutants de la P-gp envers ces deux agents chimiothérapeutiques. Ces résultats confirment qu'une diminution de l'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 favorise les activités de transport et de liaison au substrat de la P-gp ainsi que la MDR. L'ensemble de nos résultats démontre que le niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 est important dans la régulation des activités associées à la P-gp mais n'influe pas sur l'expression de la P-gp.

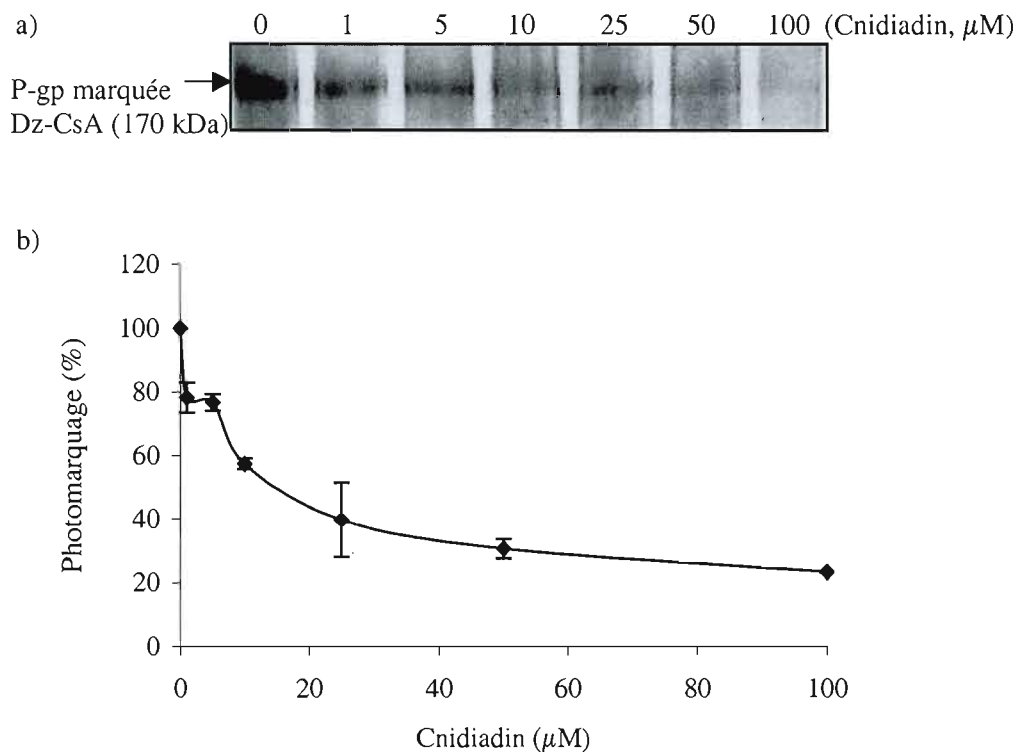


Figure 4.1 : Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp par le cniadiadin chez les cellules MDCK-MDR1. a) Le photomarquage de la P-gp avec la dz-CsA (100 nM) a été effectué en présence de concentration croissante de cniadiadin. La quantité de P-gp marquée à la dz-CsA fut déterminée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps monoclonal dirigée contre la CsA. Le témoin, DMSO à 0,1%, représente le 100% du photomarquage. b) Les bandes correspondantes furent analysées par densitométrie au laser et les résultats présentés sont la moyenne  $\pm$  SD,  $n=3$ .

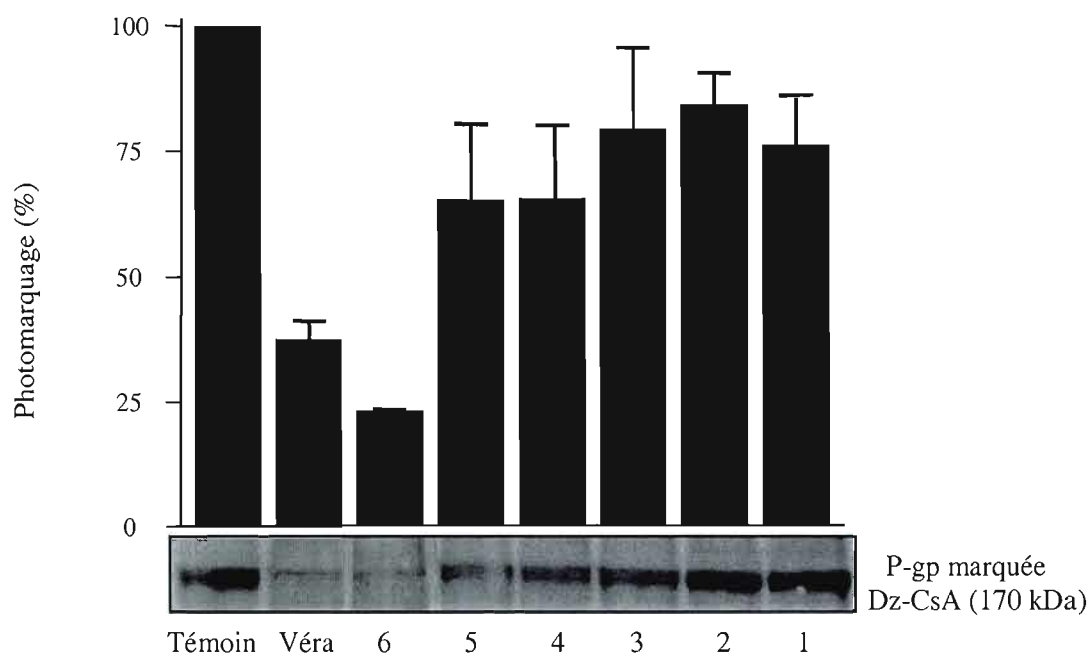


Figure 4.2 : Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp par les coumarins chez les cellules MDCK-MDR1. Le photomarquage de la P-gp par la dz-CsA (100 nM) a été effectué en présence de 10  $\mu$ M de vérapamil et 100  $\mu$ M des différents coumarins; 1) umbelliferone, 2) esculetin, 3) esculin, 4) psoralen, 5) angelicin, 6) cnidiadin. La quantité de P-gp marquée à la dz-CsA fut déterminée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps monoclonal dirigée contre la CsA. Le témoin, DMSO à 0,1%, représente le 100% du photomarquage. Les bandes correspondantes furent analysées par densitométrie au laser et les résultats présentés sont la moyenne  $\pm$  SD, n=3.

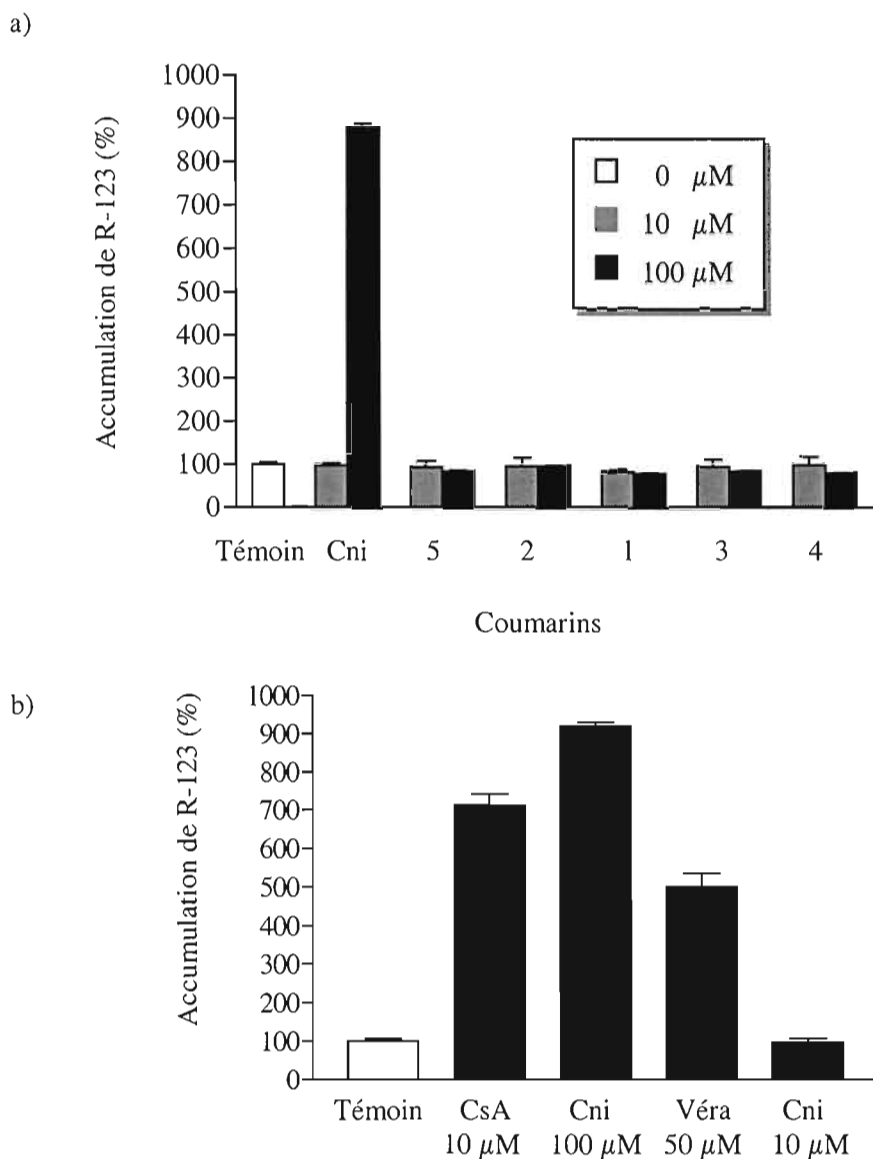


Figure 4.3 : Effet des coumarins sur l'accumulation intracellulaire de R-123. a) L'accumulation intracellulaire de R-123 fut mesurée sur une période de 2 heures chez les cellules MDCK-MDR1 en présence de 10 et 100  $\mu\text{M}$  de coumarins : 1) umbelliférone, 2) esculetin, 3) esculin, 4) psoralen, 5) angelicin, cni) cnidiadin. b) L'accumulation intracellulaire provoquée par le cnidiadin à 100  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  est comparée avec celle provoquée par 10  $\mu\text{M}$  de CsA et 50  $\mu\text{M}$  de vérapamil. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage en relation avec le témoin et représentent la moyenne  $\pm$  SD,  $n=3$ .

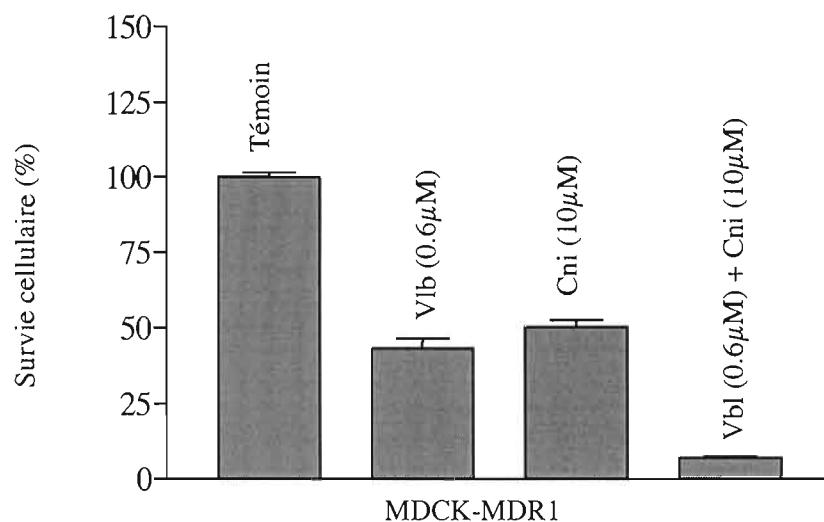


Figure 4.4 : Effet d'un cotraitement avec le cnicidin et la vinblastine sur les cellules MDCK-MDR1. La survie des cellules MDCK-MDR1, exposées à 0,6  $\mu$ M de vinblastine (Vbl), 10  $\mu$ M de cnicidin ou la combinaison des deux, fut évaluée après 72 heures d'incubation, à l'aide de l'essai colorimétrique WST-1. Le témoin DMSO à 0,1%, représente le 100% de survie cellulaire. Les résultats présentés sont la moyenne du pourcentage de survie  $\pm$  SD en relation avec le témoin de trois expérimentations indépendantes,  $n = 3$ .

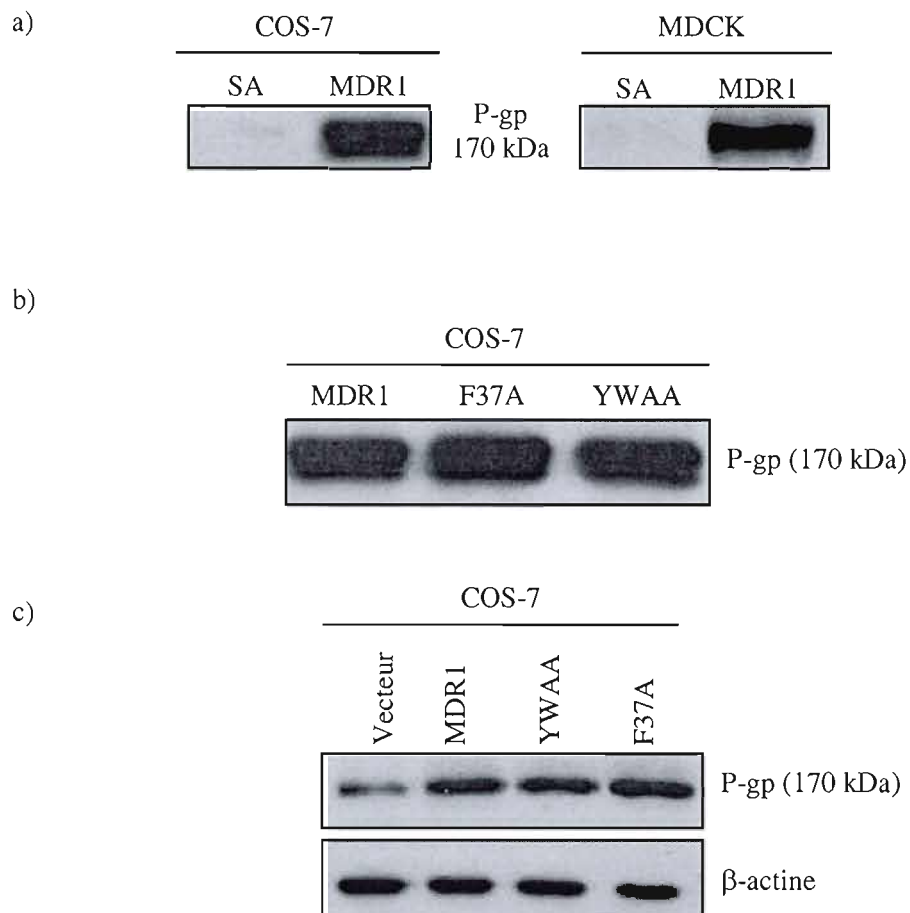
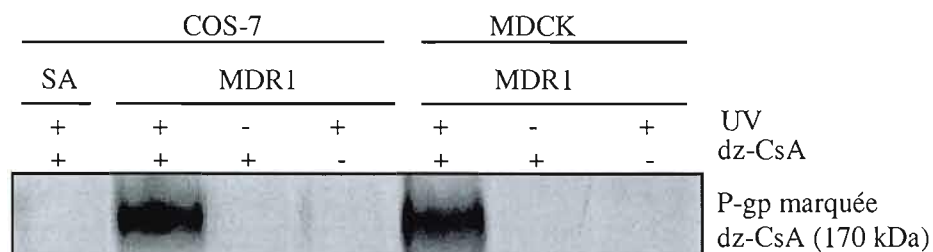


Figure 4.5 : Expression cellulaire des P-gp transfectées transitoirement. Immunodétections de type *Western blot* de 10  $\mu$ g d'homogénat protéique de cellules Cos-7 transfectées ou non transitoirement à 48 heures post-transfection, a et b, et 72 heures post-transfection, c. Les résultats électrophorétiques des P-gp transfectées (Cos-7/MDR1, Cos-7/YWAA et Cos-7/F37A) sont comparés aux témoins cellulaires n'exprimant pas la P-gp humaine, soit le type sauvage, MDCK/SA, Cos-7/SA et Cos-7/vecteur ainsi qu'au témoin cellulaire exprimant stablement la P-gp humaine, MDCK/MDR1 (n = 3).



a)



b)

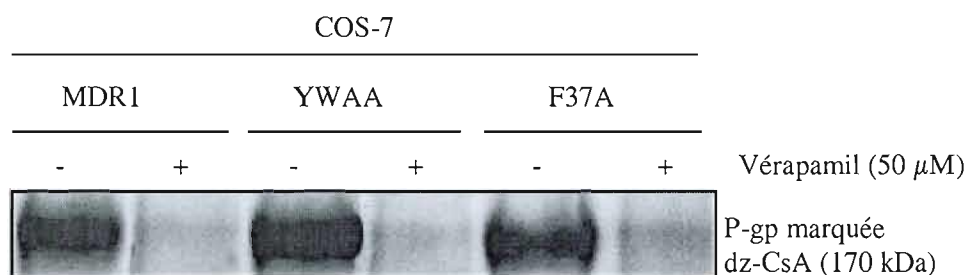


Figure 4.6 : Photomarquage à la dz-CsA des P-gp humaines transfectées transitoirement. Le photomarquage de la P-gp à la dz-CsA (100 nM) fut effectué avec 100  $\mu$ g d'homogénat protéique à 48 heures post-transfection. a) Photomarquages chez les cellules Cos-7 transfectées transitoirement avec la P-gp humaine non mutée au motif de liaison à la cavéoline-1 (Cos-7/MDR1) en comparaison avec les cellules Cos-7 de type sauvage (Cos-7/SA) et MDCK/MDR1 en présence ou non de 100 nM de dz-CsA et de lumière UV. b) Inhibition du photomarquage en présence de 50  $\mu$ M de vérapamil chez les cellules Cos-7 transfectées transitoirement avec les P-gp humaines mutées ou non, Cos-7/YWAA, Cos-7/F37A et Cos-7/MDR1, respectivement. La P-gp marquée à la dz-CsA fut déterminée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps monoclonal dirigée contre la CsA. Les résultats présentés proviennent d'une expérimentation indépendante de trois analyses, n=3.

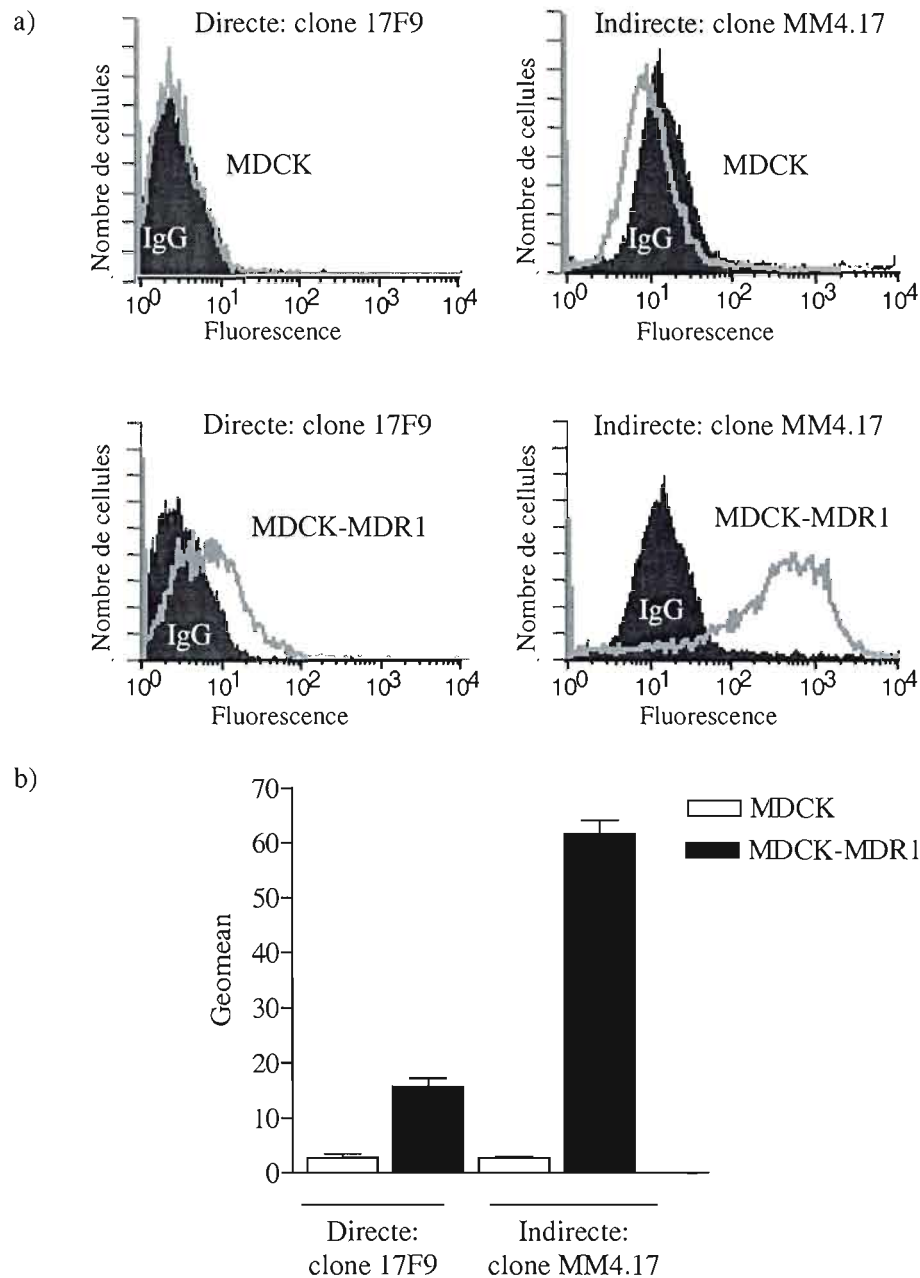


Figure 4.7 : Immunofluorescence directe et indirecte en cytométrie de flux. a)  $10^6$  cellules MDCK et MDCK-MDR1 ont été marquées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope extracellulaire de la P-gp humaine, clone 17F9 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) conjugué au FITC et le clone MM4.17 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) non conjugué. b) La fluorescence enregistrée à la surface des cellules est présentée en unité *geomean* en fonction de la technique directe ou indirecte utilisée. La fluorescence associée à 10 000 cellules a été mesurée au FACSCAN et analysée avec le logiciel CellQuest. Les résultats présentés en a) proviennent d'une expérimentation indépendante de trois analyses,  $n=3$ . Les résultats présentés en b) sont la moyenne  $\pm$  SD,  $n=3$ .

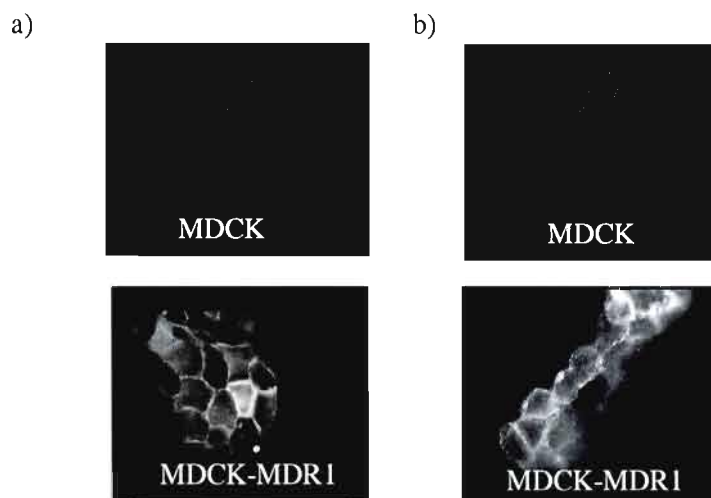


Figure 4.8 : Immunocytochimie de la P-gp humaine par microscopie à fluorescence. L'immunocytochimie fut effectuée avec 3 000 cellules MDCK et MDCK-MDR1 préalablement déposées et incubées durant 24 heures sur des lamelles acidifiées avant d'être fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (V/V) durant 10 min. a) Immunocytochimie directe de la P-gp humaine avec le clone 17F9 à  $10\mu\text{g/ml}$  et b) immunocytochimie indirecte de la P-gp humaine avec le clone MM4.17 à  $1\mu\text{g/ml}$ . Les résultats présentés proviennent d'une expérimentation indépendante de deux analyses,  $n=2$ .

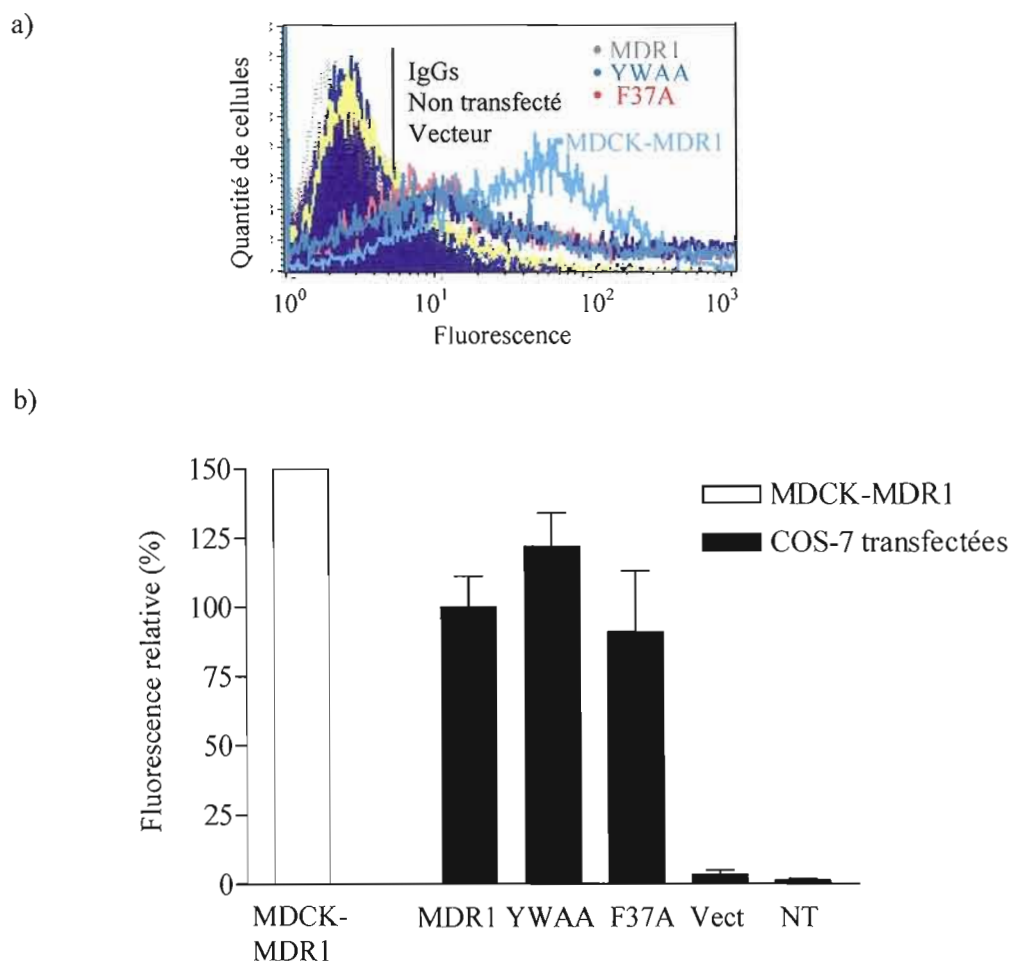


Figure 4.9 : Expression à la surface cellulaire des P-gp humaines transfectées transitoirement. L'immunofluorescence indirecte en cytométrie de flux a été effectuée avec  $10^6$  cellules marquées avec le clone MM4.17 (1  $\mu\text{g/ml}$ ). La fluorescence associée à 10 000 cellules a été mesurée au FACSCAN et analysées avec le logiciel CellQuest, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. a) Expression des P-gp humaines à la surface des cellules Cos-7 transfectées MDR1, YWAA et F37A en comparaison aux cellules Cos-7 non transfectées (NT), vecteur seul (Vect) et le témoin positif (MDCK-MDR1). b) Fluorescence relative à la surface des cellules analysées en a, où les résultats sont exprimés en pourcentage de la fluorescence relative en relation avec les cellules Cos-7 transfectées MDR1 (100%). Les résultats présentés en a) proviennent d'une expérimentation indépendante de trois analyses,  $n=3$ . Les résultats présentés en b) sont la moyenne  $\pm$  SD de  $n=3$ .

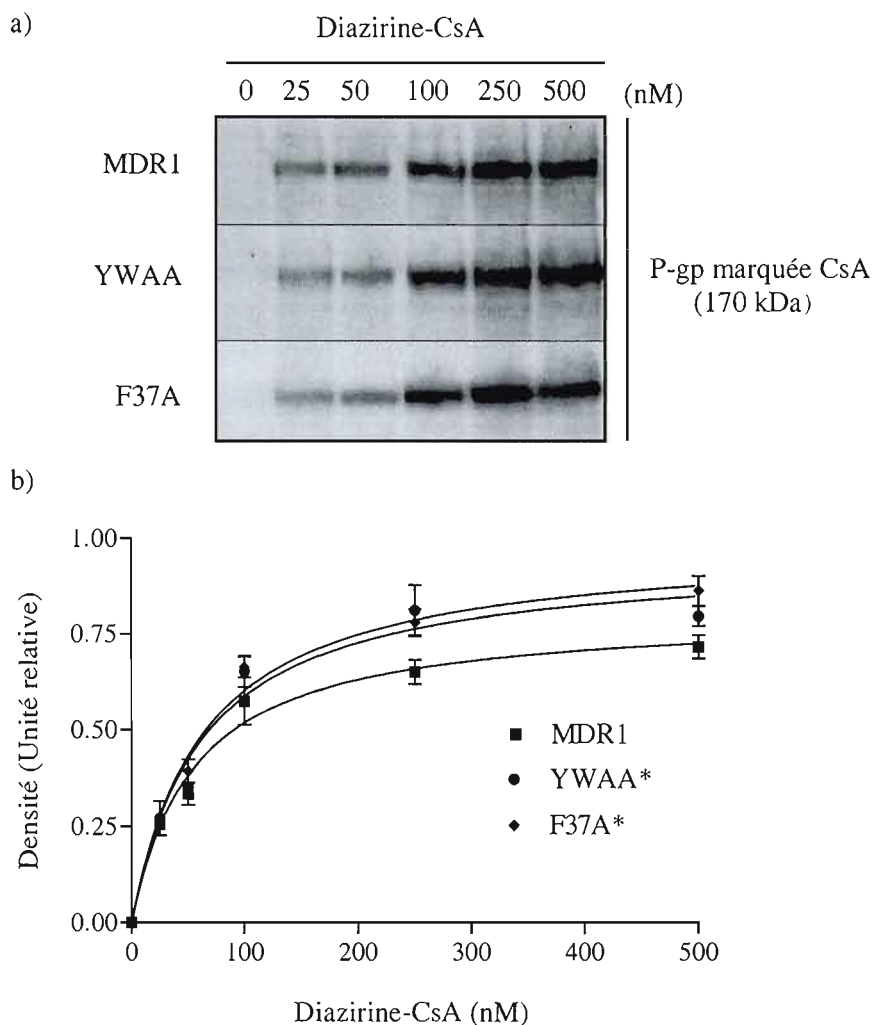


Figure 4.10 : Effet des mutations de la protéine MDR1 sur son activité de liaison au substrat dz-CsA. a) Photomarquage à concentration croissante de dz-CsA chez les cellules Cos-7 transfectées transitoirement MDR1, YWAA et F37A (100  $\mu$ g d'homogénat). La quantité de P-gp marquée à la dz-CsA a été déterminée par *Western blot* avec un anticorps monoclonal dirigé contre la CsA. b) Analyse graphique de la densité relative du photomarquage à concentration croissante de dz-CsA. Les bandes correspondantes furent analysées par densitométrie au laser et les résultats présentés sont la moyenne  $\pm$  SD de n=3 (\*p<0,05).

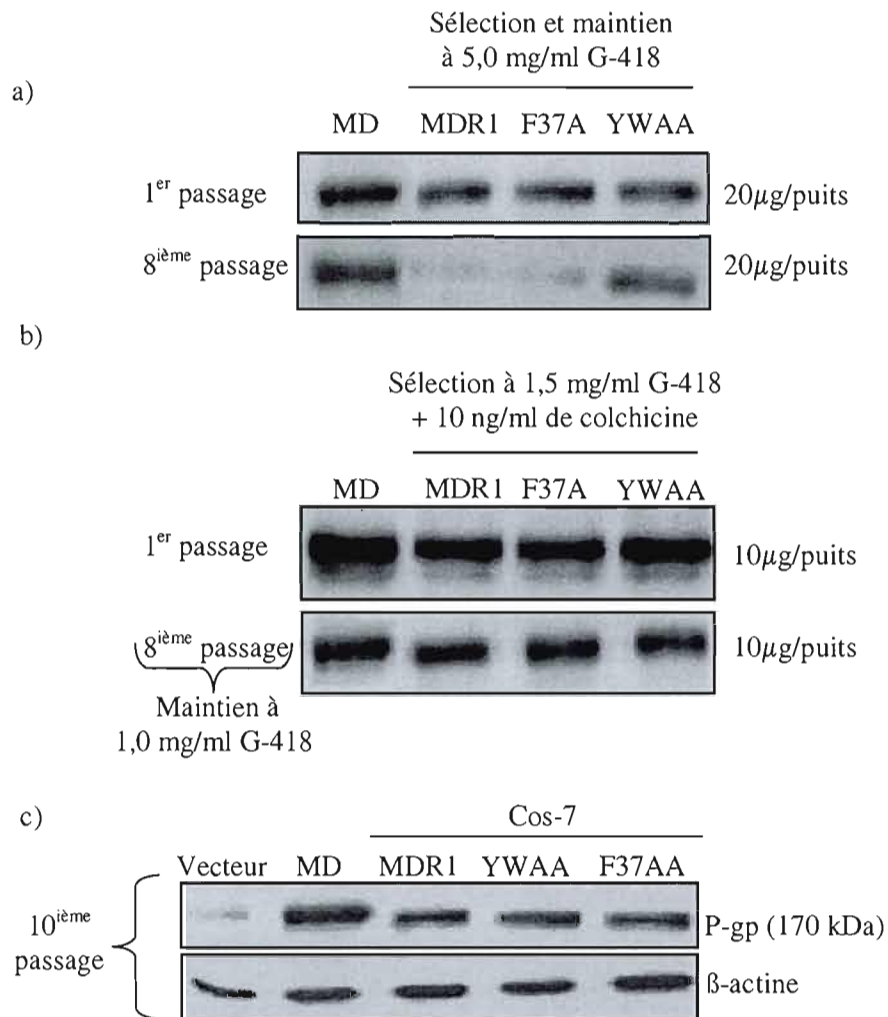


Figure 4.11 : Sélection clonale des P-gp humaines transfectées chez les cellules Cos-7. La sélection clonale est effectuée à 24 heures post-transfection durant une période de 10 jours, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Des immunodétections envers la P-gp de type *Western blot* ont été effectuées avec l'anticorps monoclonal C219 au premier et 8<sup>ème</sup> passage cellulaire en comparaison avec le témoin cellulaire positif, MDCK-MDR1 (MD). a) Sélection clonale et propagation cellulaire en présence de 5 mg/ml de généticine (G-418) où 20 µg d'homogénat protéique ont été immunodétections envers la P-gp. b) Optimisation de la sélection clonale en présence de 1,5 mg/ml de G-418 et 10 ng/ml de colchicine où 10 µg d'homogénat protéique ont été immunodétections. Les sélectants obtenus ont été maintenu à 1,0 mg/ml de G-418. c) Immunodétection de 10 µg d'homogénat protéique du 10<sup>e</sup> passage cellulaire de l'optimisation clonale des sélectants Cos-7 : vecteur, MDR1, YWAA et F37A, comparé au témoin positif (MD).

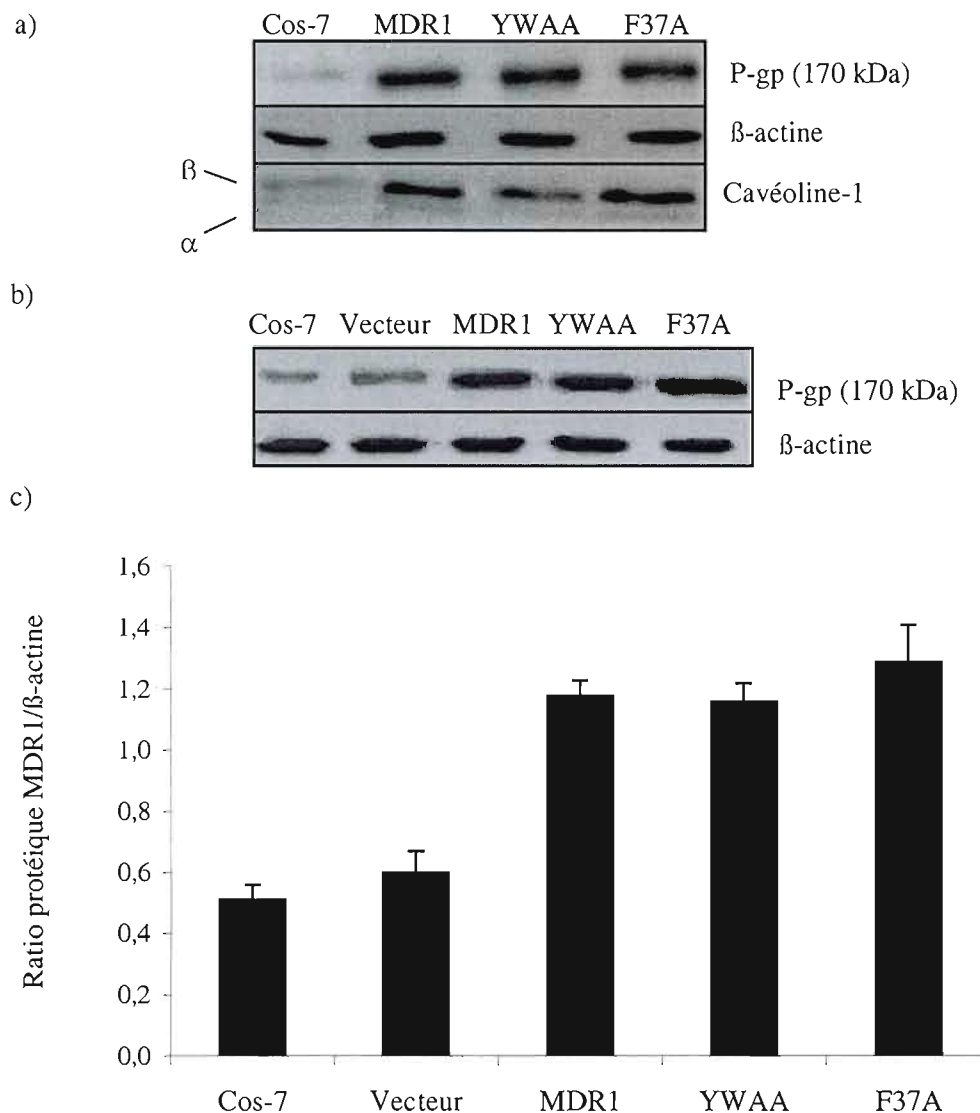


Figure 4.12 : Expression cellulaire des P-gp transfectées chez les sélectants Cos-7. a et b) Immunobuvardages de type Western de 10  $\mu$ g d'homogénat protéique des sélectants Cos-7, non transfectés (Cos-7), vecteur seul, P-gp humaine non mutée (MDR1) et P-gp humaines mutées au motif de liaison de la cav-1 (YWAA et F37A). Les aliquots ont été immunodétectés envers la P-gp (clone C-219), envers la cavéoline-1 (clone 2297) et envers la  $\beta$ -actine ( $n \geq 3$ ). b) Compilation des immunobuvardages sous forme de ratio protéique MDR1/ $\beta$ -actine. L'analyse électrophorétique du ratio d'expression protéique MDR/ $\beta$ -actine a été effectuée avec le logiciel de densitométrie au laser IP labGel ( $n \geq 3$ ).

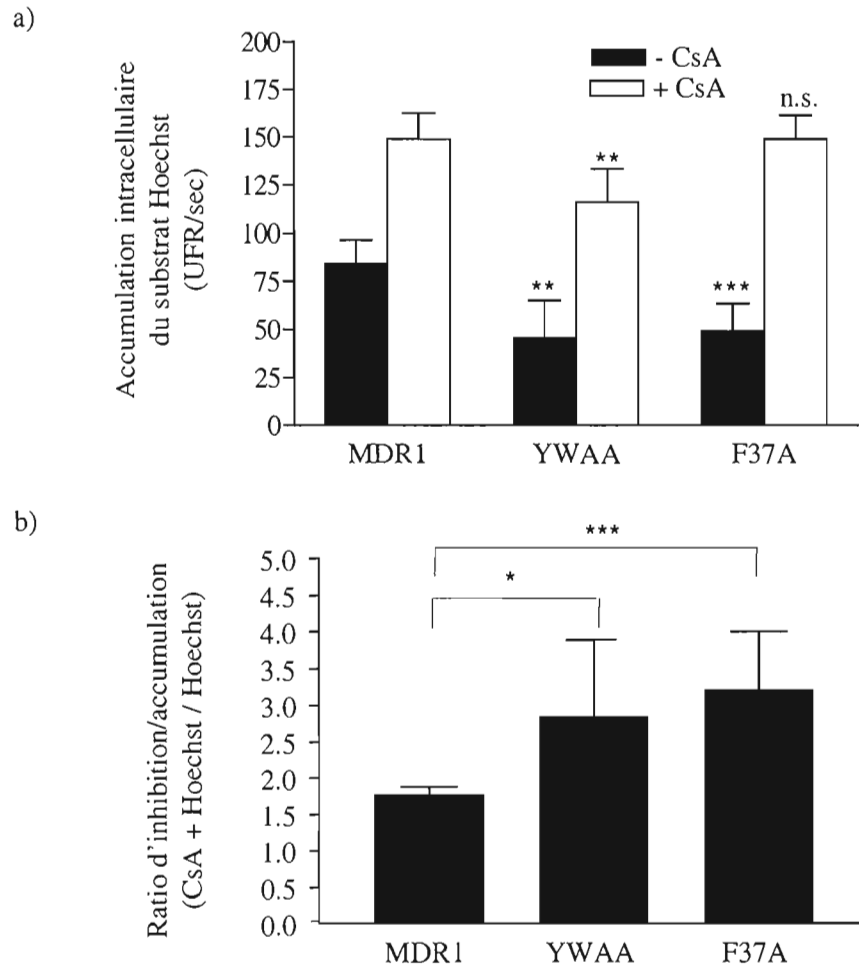


Figure 4.13 : Effet des mutations de la P-gp sur l'accumulation intracellulaire de Hoechst. a) L'accumulation intracellulaire du substrat Hoechst ( $1 \mu\text{M}$ ) fut mesurée sur une période d'une heure chez les sélectants Cos-7 : MDR1, YWAA et F37A, en présence ou non de  $10 \mu\text{M}$  de CsA. b) Ratio de l'inhibition de l'accumulation intracellulaire sur l'accumulation intracellulaire du substrat Hoechst chez les sélectants Cos-7 : MDR1, YWAA et F37A. Les résultats présentés sont la moyenne des unités relatives de fluorescence obtenues  $\pm$  SD en relation avec le témoin (100% accumulation à 0,1% d'éthanol, non présenté dans les résultats) de trois expérimentations indépendantes (YWAA et F37A comparés à MDR1, \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ).



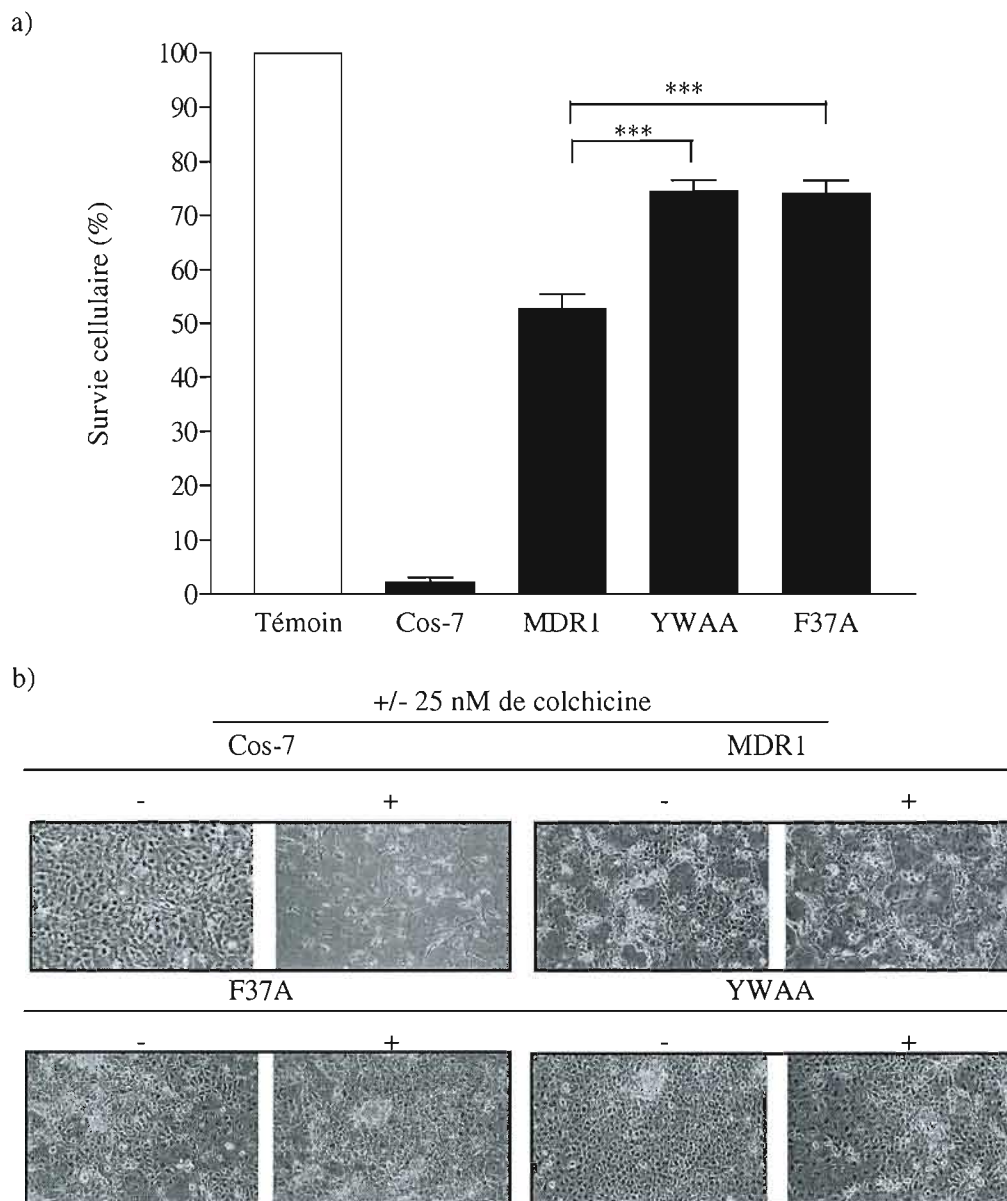


Figure 4.14 : Effet des mutations de la P-gp sur la survie cellulaire en présence de 25 nM de colchicine. a) La survie cellulaire des cellules Cos-7 et des sélectants MDR1, YWAA et F37A exposés à 25 nM de colchicine durant 72 heures a été mesurée à l'aide de l'essai colorimétrique WST-1. Cos-7 représente les cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur seul et/ou exposées au réactif de transfection et exposées aux mêmes conditions de culture que les sélectants, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les résultats présentés sont la moyenne du pourcentage de survie  $\pm$  SD en relation avec le témoin (0,2% de DMSO, 100% de survie cellulaire) de trois expérimentations indépendantes où chaque concentration a été évaluée minimalement en triplicata (MDR1/YWAA\*\*\* et MDR1/F37A\*\*\*  $p < 0,0001$ ). b) Observation cellulaire en présence ou non de 25 nM de colchicine.

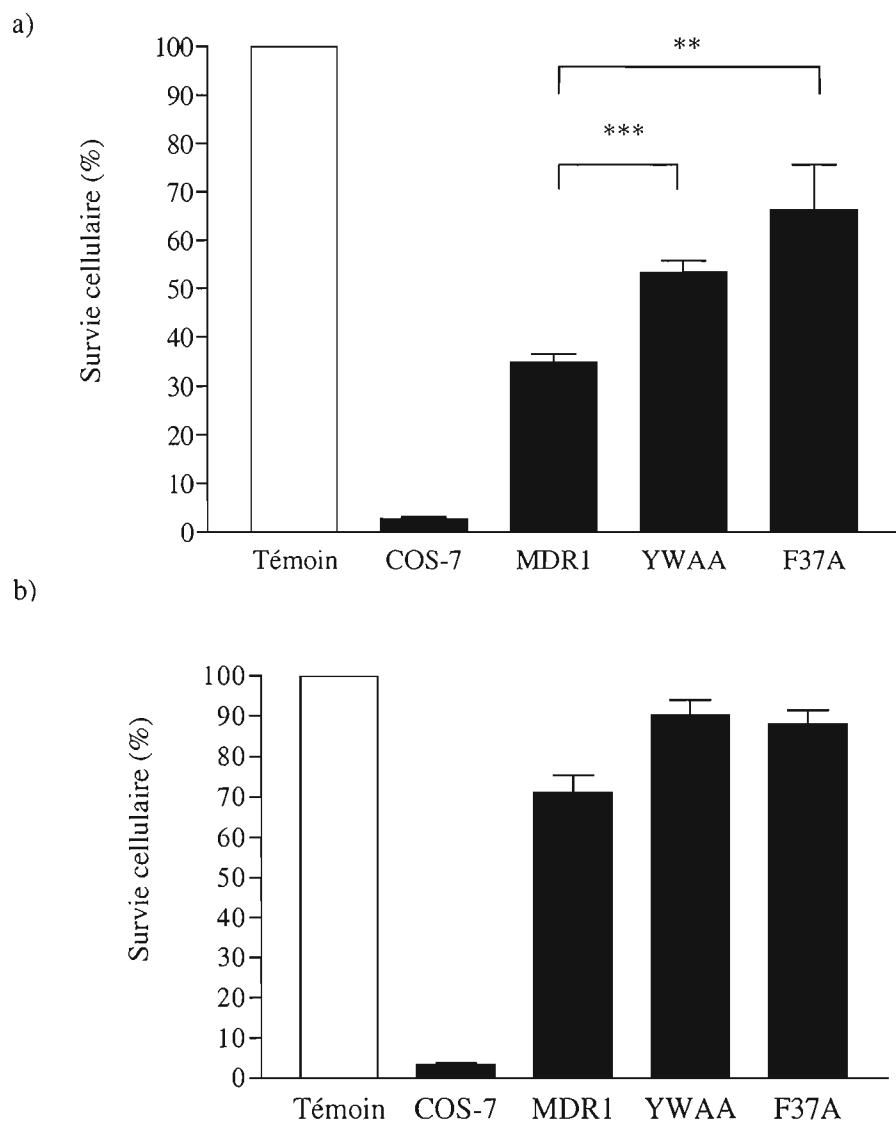


Figure 4.15 : Effet des mutations de la P-gp sur la survie cellulaire en présence d'agents chimiothérapeutiques. La survie cellulaire des cellules Cos-7 et des sélectants MDR1, YWAA et F37A exposés à a) 10 nM de vinblastine ou b) 5 nM de Taxol, durant 72 heures a été mesuré à l'aide de l'essai colorimétrique WST-1. Cos-7 représente les cellules Cos-7 transfectées avec le vecteur seul et/ou exposées au réactif de transfection et exposées aux mêmes conditions de culture que les sélectants, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les essais à la vinblastine ont été évalué minimalement en quintuplicate et les résultats présentés sont la moyenne du pourcentage de survie  $\pm$  SD en relation avec le témoin (0,2% DMSO, 100% de survie cellulaire) de cinq expérimentations indépendantes (\*\*\* $p$  < 0,0001, \*\*  $p$  < 0,001). L'essai au taxol a été évalué en quintuplicate et les résultats sont la moyenne du pourcentage de survie  $\pm$  l'écart à la moyenne en relation avec le témoin (0,2% DMSO, 100% de survie cellulaire) de  $n = 1$ .

Tableau 4.16.1: Compilation des IC<sub>50</sub>

	Vinblastine IC <sub>50</sub>	Taxol IC <sub>50</sub>
	(nM)	(nM)
COS-7 <sup>p</sup>	0,5 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>b</sup>
MDR1	6,5 ± 0,25 <sup>a*</sup>	3,2 ± 0,37 <sup>b</sup>
YWAA	11,0 ± 0,51 <sup>a**</sup>	8,9 ± 0,72 <sup>b</sup>
F37A	14,5 ± 2,70 <sup>a*</sup>	7,8 ± 0,61 <sup>b</sup>

<sup>p</sup> lignée parentale, <sup>a</sup> ± SD (\* p< 0,05, \*\* p< 0,001)

<sup>b</sup> ± écart à la moyenne

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

Beaucoup d'intérêts et d'efforts sont déployés pour connaître les mécanismes de régulation de la P-gp, où du moins, identifier des molécules qui ont les propriétés à moduler les activités de liaison et de transport de ses substrats. Car, de par sa fonction de transport et de ses localisations anatomiques stratégiques, la P-gp induit des échecs aux traitements chimiothérapeutiques, elle limite la biodisponibilité des médicaments tout en favorisant une résistance multiple à différents types de médicaments, la MDR. Les capacités d'inhibition des activités de liaison et de transport de la P-gp par des molécules naturelles et des molécules endogènes retrouvées dans le microenvironnement de la P-gp seront discutées en deux volets : 1) Le cnidiadin un agent chimiosensibilisant potentiel de la P-gp et 2) Modulation des activités associées à la P-gp par son niveau d'interaction avec la cavéoline-1.

#### 5.1 Le cnidiadin un agent chimiosensibilisant potentiel de la P-gp

Les agents chimiosensibilisants peuvent inhiber l'expression, les activités de transport et de liaison des substrats de la P-gp et changer l'état des cellules résistantes en cellules sensibles permettant aux médicaments de pénétrer la cellule, et ainsi atteindre leur (s) objectif (s) thérapeutique (s) (Romiti *et al.*, 1998; Jodoin, Demeule et Béliveau, 2002; Castro et Altenberg, 1997; Di pietro *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Ohnishi *et al.*, 2000). Il a été rapporté que le cnidiadin inhibe la prolifération des cellules bronchiales de carcinome pulmonaire en bloquant le cycle cellulaire à la phase G1 (Kofinas *et al.*, 1998). Récemment, nous avons montré, en collaboration avec le Dr Barthomeuf, que le cnidiadin, un furanocoumarin présent dans certaines médications traditionnelles chinoises et utilisé en Grèce en tant qu'épice nommée, la *Kafkalithra*, de la plante *Tordylium apulum* de la famille des *Apiaceae*, module les activités de la P-gp (Barthomeuf *et al.*, 2005, Appendice A). Dans cette étude, nous avons utilisé les cellules MDCK-MDR1 en tant que modèle cellulaire surexprimant la P-gp humaine et le cnidiadin fut analysé pour ces capacités 1) à induire

l'accumulation de rhodamine-123 (cation lipophile) et de vinblastine tritiée et 2) à compétitionner avec la dz-CsA sa liaison à la P-gp. De plus, l'utilisation de différents coumarins a permis d'obtenir des informations sur la relation structure-activité la plus appropriée, dans les coumarins analysés, à moduler les activités de liaison de la P-gp.

### 5.1.1 Inhibition du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp par le cnidiadin

Les six coumarins analysés (figure 5.1) ont inhibé compétitivement le photomarquage de la P-gp à la dz-CsA, un analogue photoactivable de la CsA (Demeule, Wenger et Béliveau, 1997). En effet, l'ordre de grandeur de l'inhibition du photomarquage est supérieur chez les coumarins complexes, les furanocoumarins, en comparaison avec les coumarins simples : plus de 75% pour le cnidiadin, 34% pour l'angelicin et le psoralen, 24%, 20% et 15% pour l'umbelliferone, l'esculetin et l'esculetin, respectivement.

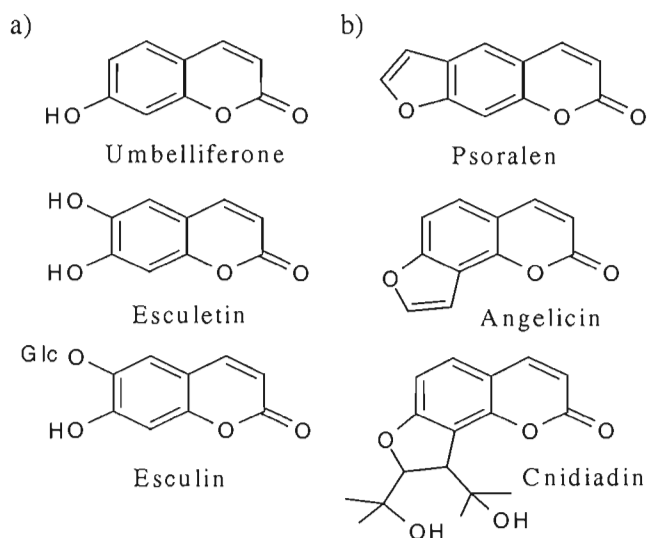


Figure 5.1 : Structure chimique de six composés naturels de la famille des coumarins : a) Coumarins simples; 7-hydroxycoumarin (umbelliferone), 6,7-dihydroxycoumarin (esculetin), 6- $\beta$ -D-glucoside/esculetin (esculin). b) Furanocoumarins; 6,7-furano-1,2-benzopyrone (psoralen), 7,8-furano-1,2-benzopyrone (angélicin) et 2'S,3'R-2,2'-hydroxyisopropyl-3,3'-hydroxyisopropyl-dihydroangélicin (cnidiadin).

La prénylation nucléaire du noyau 1,2-benzopyrone des coumarins favorise donc la liaison à la P-gp. Cependant, seul le cnidiadin a induit une inhibition prononcée du photomarquage à la dz-CsA de la P-gp et cette inhibition s'est avérée supérieure à l'inhibition induite par la vérapamil (63%), un substrat bien connu de la P-gp. Ces résultats indiquent que le noyau supplémentaire des furanocoumarins ne confère pas d'avantage supérieur à compétitionner la dz-CsA pour la liaison à la P-gp. Cette capacité de liaison du cnidiadin à la P-gp semble plutôt associée aux deux chaînes isopropylées liées au noyau dihydroangelicin plutôt qu'au noyau lui-même. Le bergamottin, par exemple, est un furanocoumarin provenant du jus de pamplemousse qui affecte les fonctions de transport de la P-gp (Wang *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2000). Ce furanocoumarin possède une chaîne linéaire hautement lipidique en comparaison avec son analogue qui affecte peu le transport de la P-gp, le 6',7'-dihydroxybergamottin, tout comme le cnidiadin avec ses deux chaînes isopropylées en comparaison avec son analogue, l'angelicin (fig. 5.2).

La structure de base du cnidiadin, le 2'S,3'R-2'hydroxyisopropyl-3'hydroxyisopropyl-dihydroangélicin, semble conférer à cette molécule trois propriétés intéressantes : 1) une conformation adéquate pour s'insérer dans la membrane plasmique, 2) une plasticité conformationnelle pour accéder aux sites de liaison sur la P-gp et 3) une structure chimique exhibant une affinité suffisante envers la P-gp.

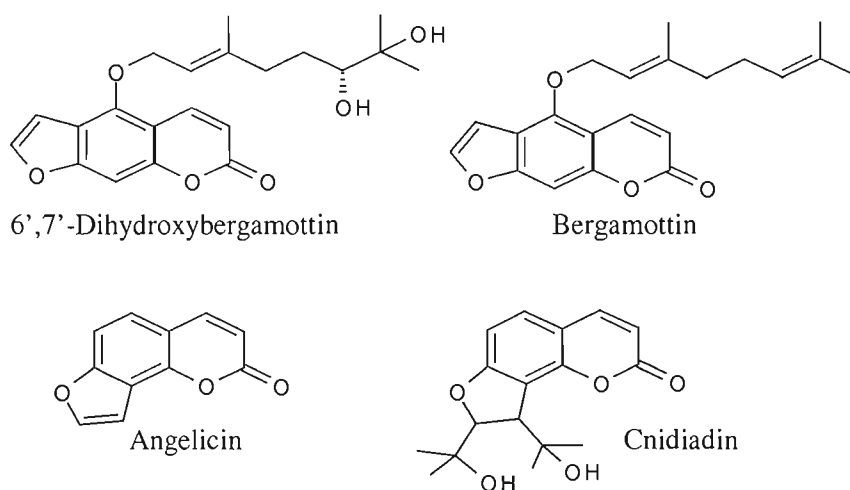


Figure 5.2 : Présentation de 4 furanocoumarins. Structures chimiques de l'angelicin et son analogue, le cnidiadin et du 6',7'-dihydroxybergamottin et de son analogue, le bergamottin.

### 5.1.2 Augmentation de l'accumulation intracellulaire de R-123 par le cnidiadin

Des essais préliminaires, en présence de CsA et de vérapamil, ont démontré que seul le cnidiadin, chez les six coumarins testés, inhibe significativement l'extrusion cellulaire de la R-123, un substrat de la P-gp (Barthomeuf *et al.*, 2005, Appendice A). À une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , le cnidiadin a provoqué une accumulation plus efficace de R-123 en comparaison avec les deux témoins positifs (CsA et vérapamil). De plus, ces résultats combinés avec ceux de l'inhibition compétitive du cnidiadin avec la dz-CsA à plus de 75% par rapport à < que 34 % pour les autres coumarins, confirment la faible capacité des coumarins, autre que le cnidiadin, à lier la P-gp. Ces résultats indiquent que le cnidiadin, en inhibant le transport de la P-gp, pourrait agir en tant qu'agent réversant de la P-gp.

### 5.1.3 Augmentation de la toxicité cellulaire de la vinblastine par le cnidiadin

Pour évaluer plus profondément le potentiel du cnidiadin en tant qu'agent réversant, nous avons analysé sa capacité à sensibiliser les cellules MDCK-MDR1 à la vinblastine, un agent chimiothérapeutique couramment utilisé. Seul le cnidiadin inhibe l'activité de transport de la P-gp et diminue synergiquement la survie cellulaire en présence de vinblastine. Donc, il est possible, que le cnidiadin puisse jouer un rôle complémentaire contre le phénotype MDR, en augmentant la biodisponibilité des médicaments aux barrières sang-tissus.

Par contre, le cnidiadin a montré des effets cytotoxiques et ceci est en accord avec les résultats précédemment rapportés chez les cellules bronchiales de carcinomes pulmonaires, les cellules NSCLC-N6 avec une  $\text{IC}_{50}$  de 39,8  $\mu\text{M}$ , où le cnidiadin agit en tant qu'inhibiteur du cycle cellulaire à la phase G1 (Kofinas *et al.*, 1998). Les cellules non cancéreuses mais surexprimant la P-gp humaine, les MDCK-MDR1, sont sensibles au cnidiadin. En effet, à 10  $\mu\text{M}$ , le cnidiadin inhibe 50% des cellules MDCK-MDR1. Lorsqu'il est utilisé en combinaison avec 0,6  $\mu\text{M}$  de vinblastine, la cytotoxicité est augmentée de 163%. Ces résultats indiquent une sensibilisation par le cnidiadin chez ces cellules résistantes à la vinblastine, mais ne permet pas d'établir si le cnidiadin apporte une cytotoxicité additive ou un effet réversant ou les deux.

À cause de sa toxicité cellulaire et de sa faible activité réversante à petite concentration, l'intérêt clinique du cnidiadin est limité en tant qu'agent chimiosensibilisant. En effet, l'inhibition de l'efflux de la P-gp peut avoir des conséquences bénéfiques, mais peut aussi contribuer à des interactions médicaments-produits naturels non désirées, tel qu'observé avec le bergamottin (section 5.1.1, fig. 5.2). Ce dernier inhibe les activités métaboliques du cytochrome P450 3A4 intestinal en induisant une modification de l'apoprotéine au niveau du site actif de l'enzyme (He *et al.*, 1998; Schmiedlin-Ren *et al.*, 1997). De plus, il inhibe les fonctions de transport de la P-gp durant l'absorption intestinale des médicaments. Ces modulations inhibitrices provoquent des interactions pharmacocinétiques qui modulent la biodisponibilité et le métabolisme des médicaments (Wang *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2000). Cependant, malgré les résultats encourageants, plusieurs études *in vivo* sont nécessaires pour évaluer si une alimentation riche en cnidiadin a des effets positifs ou délétères sur l'humain.

## 5.2 Modulation des activités de la P-gp par son niveau d'interaction avec la cavéoline-1

Certains changements cellulaires et biochimiques impliqués dans la MDR sont la conséquence d'un processus multifactoriel qui fait interagir différents mécanismes, dont une grande expression des produits géniques MDR1 et cavéoline-1, en corrélation avec une augmentation significative de la densité cavéolaire (Bosch et Croop, 1996; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998, 2001; Yang *et al.*, 1998). Ces mécanismes (P-gp et cavéoline-1) auront leur (s) apport (s) spécifique (s) sur le développement de la MDR via leur implication structurelle et fonctionnelle dans le transport du cholestérol et des médicaments (Liscovitch et Lavie, 2000; Garrigues *et al.*, 2002; Modok *et al.*, 2004; Troost *et al.*, 2004).

Certaines études ont rapporté que chez plusieurs lignées cellulaires, la cavéoline-1 et la P-gp interagissent physiquement entre-elles via le motif consensus de liaison à la cavéoline-1 sur la P-gp et le domaine SCD de la cavéoline-1 (Cai et Chen, 2004; Jodoin *et al.*, 2003; Demeule *et al.*, 2000; Razani *et al.*, 2001 et Okamoto *et al.*, 1998). Récemment, nous avons montré que l'interaction entre la cavéoline-1 et les P-gp mutantes à leur motif de liaison à la cavéoline-1 est réduite d'environ 40% provoquant en moyenne une augmentation de 33% de



l'activité de transport du substrat Hoechst, suggérant une régulation négative du transport de la P-gp par la cavéoline-1 (tableau 2.1, Jodoin *et al.*, 2003). Cependant, l'impact fonctionnel du niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 sur les activités associées à la P-gp, telles que son expression, sa localisation, ses activités de liaison et de transport de ses substrats ainsi que l'impact sur la MDR sont peu connus et sera discuté dans les prochaines sections.

### 5.2.1 Expression et localisation à la surface cellulaire des P-gp humaines transfectées

Les résultats en immunobuvardage de type *Western blot* et en immunofluorescence indirecte analysée en cytométrie de flux, montrent que le niveau de P-gp cellulaire ainsi que son expression à la surface des cellules chez les mutants de la P-gp sont similaires et exprimés au même niveau que la P-gp humaine non mutée à son motif de liaison à la cavéoline-1. Ces résultats suggèrent que les deux séquences, le motif de liaison à la cavéoline-1 sur la protéine MDR1 et le SCD de la cavéoline-1, ne sont pas impliquées dans le transport des molécules MDR1 à la surface cellulaire. En effet, des études structurales sur la cavéoline-1 ont démontré qu'elle se transporte principalement via son attachement à la membrane grâce à son domaine transmembranaire, des acides aminés 168 à 178, et que le SCD est un domaine d'échafaudage moléculaire permettant l'agrégation de différentes molécules localisées dans les cavéoles (Schlegel et Lisanti, 2000). De plus, les P-gp humaines mutées ou non au motif de liaison à la cavéoline-1 sont exprimées sous une forme reconnue par ses substrats. En effet, le photomarquage des P-gp par la dz-CsA fut compétitivement déplacé par la vérapamil lors des analyses d'expression des P-gp humaines transfectées.

Cependant, en considérant que la P-gp et la cavéoline-1 interagissent physiquement, les gènes MDR1 et cavéoline-1 devraient être régulés en coordination un de l'autre (Pang, Au et Kwong, 2004). Par contre, lorsque nous avons évalué le niveau d'expression entre les transfectants Cos-7 transitoires et les cellules Cos-7 non transfectées, l'expression de la cavéoline-1 est restée constante (résultats non présentés). Toutefois, lors de la sélection clonale, les cellules Cos-7 transfectées MDR1 mutées ou non sont exposées durant 10 jours à

10 ng/ml de colchicine, un agent chimiothérapeutique qui favorise une sélection rigoureuse du système MDR1, et nous avons observé que l'expression de la cavéoline-1 chez les sélectants tend à augmenter.

Ces résultats sont en accord avec le modèle proposé d'adaptation cellulaire, par l'équipe du Dr Lavie, 2000 et 2001. Ce modèle est que suite à une exposition à des xénobiotiques toxiques ou à des agents chimiothérapeutiques, les cellules pour prévenir les effets létaux de ces composés, régulent en coordination deux mécanismes de la MDR, surexpression des produits géniques MDR1 et cavéoline-1 (Lavie et Liscovitch, 2000; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001; Pang, Au et Kwong, 2004). En effet, car en fonction du modèle général de modulation négative du SCD de la cavéoline-1 envers plusieurs molécules de signalisation, des variances dans son expression devraient profondément affecter les fonctions cellulaires (Razani *et al.*, 2001). En conséquence, l'expression de la cavéoline-1 est fortement régulée par la cellule et ceci en fonction de l'état cellulaire: forte expression chez les cellules épithéliales en différenciation terminale et lors de l'acquisition de la MDR et forte régulation à la baisse chez les cellules en transformation oncogénique (Razani *et al.*, 2001; Lavie et Liscovitch, 2000). Donc, une simple surexpression de transporteurs, dont la P-gp, ne semble pas suffisante pour conférer un phénotype MDR complet. Il faut observer aussi une surexpression de la cavéoline-1, telle que rapportée par plusieurs études (Bosch et Croop, 1996; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998, 2001; Yang *et al.*, 1998).

### 5.2.2 Augmentation de l'activité de liaison et de l'efflux chez les P-gp mutées

Le graphique de liaison maximale de la dz-CsA à la P-gp montre significativement, pour la première fois, qu'une diminution d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 provoque un marquage plus intense chez les mutants de la P-gp. Ces résultats suggèrent une activité de liaison plus prononcée. De plus, toujours chez les mutants de la P-gp, l'activité de transport du substrat Hoechst de la P-gp est plus accrue. Nous avons mesuré une diminution de l'accumulation intracellulaire de 45% qui est compétitivement inhibée par 10  $\mu$ M de CsA. L'ensemble de ces résultats sont en accord avec nos résultats antérieurs (Jodoin *et al.*, 2003).

Il a été rapporté que les cellules MDR Hs578T/doxorubicine exprimant fortement la P-gp mais peu de cavéoline-1, lorsqu'elles sont transfectées avec la cavéoline-1 elles redeviennent sensibles à la doxorubicine. En effet, la surexpression de la cavéoline-1 a diminué l'activité de transport de la P-gp et transformer ces cellules résistantes en cellules sensibles (Cai et Chen, 2004). Cette équipe suggère que la modulation négative de la P-gp par la cavéoline-1 peut être due à deux mécanismes : 1) interaction physique entre les deux protéines cavéolaires induisant une inhibition fonctionnelle des activités de transport de la P-gp (Jodoin *et al.*, 2003; Cai et chen, 2004). Ce qui est en accord aussi avec les présents résultats d'accumulation intracellulaire et 2) mécanisme alternatif indirect d'inhibition des activités de transport de la P-gp lorsqu'il y a augmentation de la fluidité membranaire provoquée par la surexpression de la cavéoline-1 (Cai, Zhu et Chen, 2004).

Le ratio d'inhibition sur l'accumulation intracellulaire, montre que les mutants de la P-gp au motif de liaison à la cavéoline-1, possèdent un état de sensibilisation à la CsA supérieur à la P-gp non mutée (MDR1; 1,76; YWAA; 2,54 et F37A; 3,05). Ces résultats suggèrent un impact possible sur la résistance cellulaire chez les P-gp mutées au motif de liaison à la cavéoline-1. Cependant, entre les deux mutants, le simple mutant F37A est plus sensibilisé à la CsA (3,05 vs 2,54). La phénylalanine à la position 37 du motif de liaison à la cavéoline-1 semble importante dans cette régulation négative de la cavéoline-1 sur la P-gp du moins pour un composé structurel donné, la CsA.

Nous avons également observé que la sélection en présence de colchicine chez les transfectants en comparaison avec les transfectants transitoires utilisés antérieurement par notre équipe a induit une modulation du transport de la P-gp plus profonde. En effet, les résultats d'accumulation du substrat Hoechst chez les transfectants transitoires (non exposés à la colchicine) diminuent de 33% (Jodoin *et al.*, 2003). Tandis que chez les sélectants l'accumulation de Hoechst diminue de 45%, suggérant qu'une surexpression de la P-gp n'a pas autant d'impact que celui acquis par des expositions aux médicaments (Yu *et al.*, 1991; Lavie et Liscovitch, 2000; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001).

### 5.2.3 Augmentation de la survie et de la résistance aux médicaments chez les P-gp mutées

Les essais de prolifération cellulaire en présence de colchicine, de vinblastine et de Taxol démontrent, pour une première fois, qu'une diminution de l'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 influe sur la résistance cellulaire. En effet, chez les mutants de la P-gp, la survie cellulaire a été augmentée en moyenne envers la colchicine, le Taxol et la vinblastine de 23%. De plus, les  $IC_{50}$  obtenues envers la vinblastine et le Taxol démontrent un taux de résistance moyen de 2,3 fois supérieur à la P-gp humaine non mutée à son motif de liaison à la cavéoline-1. D'un point de vue mathématique, l'impact de cette diminution de l'interaction sur la résistance semble minime, mais d'un point de vue clinique, cela peut entraîner l'échec du traitement anticancéreux. L'ensemble de ces résultats confirment que le domaine SCD de la cavéoline-1 maintient son profil d'inhibiteur fonctionnel des activités envers la P-gp, tout comme avec plusieurs molécules de signalisation localisées dans les cavéoles (Okamoto *et al.*, 1998; Labrecque *et al.*, 2003; Engelman *et al.*, 1998; Smart *et al.*, 1999; Lavie, Fiucci et Liscovitch, 2001).

L'étude de Cai et Chen, 2004, sur la relation fonctionnelle entre la P-gp et la cavéoline-1, a démontré une augmentation de l'accumulation de R-123 d'environ 8 fois lorsque les cellules transformées et résistantes à la doxorubicine (Hs578T/Doxo) ont été transfectées avec la cavéoline-1. Tandis que chez nos cellules non transformées et sensibles, les cellules Cos-7, une surexpression de P-gp transfectée et non mutée a diminué l'accumulation de Hoechst d'environ 20%. Une surexpression de P-gp transfectée et mutée à son site de liaison à la cavéoline-1 a induit une diminution de l'accumulation de plus de 50%. Il est intéressant de remarquer, malgré que la comparaison se fait entre des cellules non transformées et transformées ainsi que deux substrats différents de la P-gp, que la cavéoline-1 semble avoir un impact important sur la résistance cellulaire. Ce qui nous amène à suggérer que la régulation négative de la cavéoline-1 sur l'activité de transport de la P-gp est importante par rapport à une surexpression de la P-gp dans le phénotype MDR.

En effet, il est reconnu que chez les cellules cancéreuses ou non, la surexpression de la P-gp contribue à la résistance multiple et est considérée comme l'obstacle majeur à la réussite des différents traitements, dont la chimiothérapie, entre autres (Ambudkar *et al.*, 1999; Borst et Elferink, 2002; Gottesman, 2002 et Gottesman *et al.*, 2002). Cependant, l'expression à la

surface cellulaire des P-gp humaines transfectées est à plus de 70 fois supérieure en comparaison avec la lignée Cos-7 parentale. Cette surexpression de la P-gp n'est pas en corrélation avec une augmentation marquée de la résistance cellulaire à la vinblastine de 0,5 nM pour les cellules Cos-7 parentales à 6,5 nM pour les cellules Cos-7 transfectées avec la P-gp non mutée (Ramachandran *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1995; Leith *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent encore que le niveau d'interaction entre ces deux protéines semble plus important dans la résistance que la surexpression de la P-gp.

Nos résultats ont démontré qu'entre les deux alcaloïdes utilisés dans cette étude (Taxol et vinblastine), le taux de résistance entre les cellules Cos-7 transfectées avec la P-gp non mutée et les cellules non transfectées est de 8 fois par rapport à 13, respectivement. Ces données, suggèrent que la relation structure-activité d'un composé doit aussi être considéré comme faisant partie du processus multifactoriel de la MDR. Car pour un composé ayant une structure particulière (vinblastine) par rapport à un autre composé (Taxol), une surexpression de la P-gp peut être insuffisante pour induire une résistance marquée, d'autres mécanismes sont nécessaires, dont le niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1. D'autres études axées sur la relation structure-activité de composés de la même famille combinées à des mesures du niveau d'interaction (immunoprécipitation) entre la P-gp et la cavéoline-1 seraient nécessaire pour approfondir cette particularité.

L'ensemble de nos résultats démontrent que le niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 peut être un mécanisme cellulaire pour contrôler ce transporteur. En effet, considérant le rôle de protection qu'assure la P-gp à la barrière sang-cerveau, BSC (Schinkel, 1999; Fromm, 2004, section 1.8) une modification de la densité des cavéoles et de leurs constituants (Lavie et Liscovitch, 2000, section 1.10) pourrait affecter l'homéostasie du cerveau. Notre équipe a rapporté, une grande diminution de l'expression de la cavéoline-1 chez les cellules endothéliales tumorales du cerveau en comparaison aux cellules endothéliales d'un cerveau sain (Régina *et al.*, 2004). Puisque la cavéoline-1 inhibe l'activité de transport de la P-gp, une réduction de l'expression de la cavéoline-1 chez les cellules endothéliales du cerveau, pourrait affecter le transport des médicaments au travers de la barrière sang-cerveau, et ainsi diminuer l'efficacité de la chimiothérapie.

En effet, une plus faible interaction entre ces deux protéines augmente significativement le taux de résistance cellulaire aux agents chimiothérapeutiques, suggérant que ces deux

protéines sont fonctionnellement reliées dans la MDR (Pang, Wing et Kwong, 2004). Leur relation fonctionnelle dans la MDR semble liée à leur colocalisation cavéolaire ainsi qu'à leur rôle dans le transport intracellulaire du cholestérol, qui seraient la base du processus MDR (Liscovitch et Lavie, 2000; Fielding, 1995; Uittenbogaard *et al.*, 1998; Fielding *et al.*, 1999).

L'hypothèse de régulation coordonnée entre la P-gp et la cavéoline-1 supporte l'hypothèse d'adaptation cellulaire. Cette voie métabolique d'adaptation cellulaire est soupçonnée faciliter le transport des médicaments des compartiments intracellulaires à la membrane plasmique (Liscovitch et Lavie, 2000). C'est à dire, que les médicaments interagissent avec la bi-couche lipidique de la membrane par diffusion. Les médicaments iront se partitionner dans les différentes phases des nombreuses membranes intracellulaires avant d'atteindre l'échafaudage moléculaire formé par la cavéoline-1 lors du transport et efflux du cholestérol. Deuxièmement, par ce même échafaudage moléculaire, les médicaments parviendront à la membrane plasmique dans les domaines riches en cholestérol et en cavéoline-1, où la P-gp et d'autres transporteurs rapportés pour y être localisés, les excluront finalement de la cellule. Ceci entraînera le développement d'une résistance par diminution de la concentration intracellulaire de l'agent (Liscovitch et Lavie, 2000). Cependant, la voie métabolique d'adaptation cellulaire proposée, n'exclut pas les autres mécanismes décrits à la section 1.10.

Ce processus d'adaptation cellulaire implique une augmentation des constituants et de la densité cavéolaire (Lavie, Fiucci et Liscovitch, 1998, 2001; Yang *et al.*, 1999). Les différents lipides, dont majoritairement le cholestérol, et plusieurs protéines de signalisation iront se concentrer et s'agréger pour former ainsi un échafaudage moléculaire spécialisé (Liscovitch et Lavie, 2000; Razani *et al.*, 2002, section 2.1 et 2.3.2). La présence d'agents toxiques amène une relocalisation de la P-gp au niveau des cavéoles (Demeule *et al.*, 2000). Le cholestérol est un des principaux lipides cavéolaires et modulateur important des activités de la P-gp (Jodoin *et al.*, 2003; Luker *et al.*, 2000; Modok *et al.*, 2004; Rothnie *et al.*, 2001; Troost *et al.*, 2004). Il est possible que le niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 puisse diminuer une fois la P-gp agrégée à cet échafaudage cavéolaire. Ce qui induirait chez la P-gp un efflux plus élevé de l'agent toxique entraînant ainsi une accentuation de la résistance à l'agent. Le niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 pourrait être un mécanisme cellulaire pour contrôler ce transporteur et être une partie importante du processus multifactoriel de la résistance multiples aux médicaments, ce qui demeure à être élucidé.

## CONCLUSION

Le but de cette étude fut d'évaluer les capacités inhibitrices sur les activités de liaison et de transport des substrats de la P-gp par : 1) des produits naturels présents dans la diète, tel que les coumarins et 2) par la cavéoline-1 colocalisée avec la P-gp au niveau des cavéoles. Car la P-gp, de par sa fonction de transport et de ses localisations anatomiques stratégiques, induit des échecs aux traitements chimiothérapeutiques, limite la biodisponibilité des médicaments tout en favorisant une résistance multiple à différents types de médicaments, la MDR. Deux objectifs découlent du but de l'étude : 1) renverser le phénotype MDR par des produits naturels et 2) caractériser l'impact du niveau d'interaction entre la cavéoline-1 et la P-gp sur l'activité de liaison et de transport des substrats de la P-gp, ainsi que sur le phénotype MDR.

Premièrement, nous avons démontré que le cnidiadin est capable, *in vitro*, d'inhiber compétitivement la liaison et l'efflux des médicaments de la P-gp. La capacité anti-prolifératrice de ce furanocoumarin ainsi que sa capacité à sensibiliser des cellules résistantes aux alcaloïdes suggèrent que des préparations traditionnelles et des diètes contenant du cnidiadin pourraient contribuer à 1) renverser la résistance produit par le gène MDR1 et 2) augmenter la biodisponibilité des agents chimiothérapeutiques chez l'humain. Cependant, à cause de sa toxicité cellulaire et de sa faible activité réversante à petite concentration, l'intérêt clinique du cnidiadin en tant qu'agent chimiosensibilisant et réversant semble limité.

Deuxièmement, nous avons démontré, *in vitro*, que la cavéoline-1 module négativement les activités de liaison et de transport des substrats de la P-gp. Une diminution de l'interaction physique entre la P-gp et la cavéoline-1 : 1) n'affecte pas l'expression et la localisation de la P-gp à la surface cellulaire, 2) augmente significativement l'activité de liaison du substrat à la P-gp ainsi que son extrusion de la cellule et 3) augmente significativement la survie et la résistance cellulaire en présence d'agents chimiothérapeutiques. Le niveau d'interaction entre la P-gp et la cavéoline-1 pourrait être un mécanisme cellulaire permettant de contrôler ce transporteur fonctionnellement relié à la cavéoline-1 dans la MDR. Lors d'une adaptation cellulaire, à un agent cytotoxique, les multiples agrégations moléculaires au SCD de la

cavéoline-1 pourraient accentuer la résistance à l'agent en diminuant l'interaction physique entre la P-gp et la cavéoline-1.

Certaines perspectives expérimentales peuvent être envisagées, dont le développement d'ARN interférants, qui inhibent l'expression protéique basale envers la cavéoline-1, chez des lignées cellulaires résistantes ou non. Ces essais permettraient d'inhiber l'interaction physique entre ces deux protéines et ainsi évaluer l'impact sur la distribution subcellulaire et l'activité de transport de la P-gp au niveau : 1) du passage de médicaments à la barrière sang-cerveau, 2) du développement de la MDR, 3) de la migration cellulaire et invasion tumorale et 4) de leur implication dans l'apoptose cellulaire.



## APPENDICE A

### INHIBITION OF P-GLYCOPROTEIN TRANSPORT FUNCTION AND REVERSION OF MDR1 MULTIDRUG RESISTANCE BY CNIDIADIN

## RÉSUMÉ

La surexpression du produit génique MDR1, la P-glycoprotéine (P-gp), est un des obstacles majeurs à la réussite des traitements chimiothérapeutiques. Le but de cette étude a été d'évaluer chez six coumarins naturels, dont le cnidiadin, sont potentiel pour inhiber l'activité de transport de la P-gp et ainsi renverser le phénotype de résistance multiples aux médicaments, la MDR. Le cnidiadin est un furanocoumarin couramment utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise et dans une épice commune utilisée dans l'alimentation grecque.

Dans cette étude, nous avons utilisé les cellules MDCK-MDR1 (cellules rénales canines Madin-Darby stablement transfectées avec la P-gp humaine) en tant que modèle cellulaire surexprimant la P-gp humaine et six coumarins naturels (le cnidiadin, l'umbelliferone, l'esculin, l'esculetin, l'angelicin et le psoralen) furent analysés pour leurs capacités potentiels en présence de vérapamil et de CsA (témoins positifs) 1) à induire l'accumulation de rhodamine-123 (cation lipophile) et de vinblastine tritiée et 2) à compétitionner avec la dz-CsA sa liaison à la P-gp. De plus, l'utilisation de différents coumarins a permis d'obtenir des informations sur la relation structure-activité la plus appropriée, dans les coumarins analysés, à moduler les activités de liaison de la P-gp.

Seul le cnidiadin inhibe l'activité de transport de la P-gp en augmentant l'accumulation intracellulaire des substrats de la P-gp et en diminuant synergiquement la survie cellulaire en présence de vinblastine. De plus, le cnidiadin, semble pouvoir modifier la biodisponibilité des substrats de la P-gp en inhibant compétitivement la liaison du substrat diazine-cyclosporine A (dz-CsA). Ces résultats suggèrent qu'une diète contenant du cnidiadin pourrait soit renverser le phénotype MDR, soit moduler la biodisponibilité des substrats de la P-gp, en tant qu'agent chimiosensibilisant. Cependant, à cause de sa toxicité cellulaire et de sa faible activité réversante à petite concentration, l'intérêt clinique du cnidiadin semble limité en tant qu'agent chimiosensibilisant.

Cancer Chemother Pharmacol (2005) 56: 173–181 DOI 10.1007/s00280-004-0914-y

## ORIGINAL ARTICLE

Chantal Barthomeuf - Jérôme Grassi - Michel Demeule - Chantal Fournier - Dominique Boivin - Richard Béliveau

### **Inhibition of P-glycoprotein transport function and reversion of MDR1 multidrug resistance by cnidiadin**

Received: 13 September 2004 / Accepted: 15 December 2004 / Published online: 12 April 2005 Springer-Verlag 2005

**Abstract** *Purpose:* Overexpression of P-glycoprotein (Pgp) encoded by the MDR1 gene is one of the major obstacles to successful cancer chemotherapy. The goal of this study was to evaluate if, among other natural coumarins, cnidiadin, a furanocoumarin present in traditional Chinese medications and in a spice commonly used in Greek food, inhibits Pgp transport activity and has the potential to reverse MDR1 multidrug resistance. *Methods:* Using MDR1-transfected Madin-Darby canine kidney (MDCK-MDR1) cells as a model of cells expressing the human MDR1 phenotype, and verapamil or CsA or both as positive control, we tested the capacity of six natural coumarins (umbelliferone, esculetin, cnidiadin, angelicin and psoralen) to induce the accumulation of rhodamine-123 (R-123) and [ $^3\text{H}$ ]-vinblastine ([ $^3\text{H}$ ]-VBL) and to modulate the photolabeling of Pgp by SDZ 212-122, a diazirin cyclosporin A. The growth-inhibitory effect of cnidiadin and its capacity to enhance the cell toxicity of vinblastine (VBL) or vincristine (VCR) was then evaluated by the WST-1 assay in two cell lines overexpressing Pgp (MDCK-MDR1 and vincristine-resistant KB/VCR). *Results:* Cnidiadin was the only tested coumarin capable of significantly accumulating R-123 and [ $^3\text{H}$ ]-VBL and inhibiting Pgp photolabeling in MDCK-MDR1 cells. The dose-dependent increase in [ $^3\text{H}$ ]-VBL uptake ( $\text{IC}_{50}$  26.5  $\mu\text{M}$ ) induced by cnidiadin in the dose range 1–100  $\mu\text{M}$  correlated with inhibition of Pgp photolabeling. At 10  $\mu\text{M}$  cnidiadin inhibited photolabeling by 59% and sensitized both MDCK-MDR1 and KB/VCR cells to vinca alkaloids. *Conclusion:* Cnidiadin is a cytotoxic agent capable in vitro of competitively inhibiting the binding and efflux of drug by Pgp and of enhancing the cell toxicity of vinca alkaloids in two cell lines (MDCK-MDR1 and mutant human carcinoma KB/VCR) overexpressing Pgp. This suggests that diet or traditional preparation containing cnidiadin may contribute to the reversal of MDR1 multidrug resistance and may affect the bioavailability of Pgp substrates orally administered. However, due to its cell toxicity, clinical interest in cnidiadin as a chemosensitizer appears to be limited.

**Keywords :** Coumarin - P-glycoprotein (Pgp) - Multidrug resistance (MDR) - Cancer - Reversal activity - Drug interaction

**Abbreviations** CsA: Cyclosporin A - dz-CsA: The diazirin-cyclosporin A derivative SDZ 212-122 - KB/ VCR cells: KB cell line resistant to vincristine - MDR: Multidrug resistance -

MDR1: Multidrug resistance encoded by the MDR1 gene - MDCK-MDR1 cells: MDR1-transfected Madin-Darby canine kidney cells - MRP: Multidrug resistance-associated protein - Pgp: P-glycoprotein - R-123: Rhodamine-123 - TLC: Thin-layer chromatography - VBL: Vinblastine - VCR: Vincristine

C. Barthelemy (✉)

UMR-INSERM U-484, Laboratoire de Pharmacognosie et Biotechnologies, Faculté de Pharmacie, Université d'Auvergne, Place H. Dunant, 63001 Clermont-Fd Cedex, France  
E-mail: [chantal.barthelemy@clermont1.fr](mailto:chantal.barthelemy@clermont1.fr)

Tel.: +33-4-73178026

Fax: +33-4-73150801

J. Grassi - M. Demeule - C. Fournier - R. Béliveau

Laboratoire d'Oncologie moléculaire, Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Université du Québec à Montréal, Succursale Centre-Ville, C.P. 8888, Montreal, QC, Canada

D. Boivin - R. Béliveau

Laboratoire de Médecine Moléculaire Hôpital Ste-Justine, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine, Montréal, QC, Canada

## Introduction

P-glycoprotein (Pgp) is an inducible protein transporter belonging to the ATP-binding cassette (ABC) protein family that mediates the energy-dependent efflux of many drugs, including chemotherapeutics, out of cells. In cancer cells, the overexpression of Pgp encoded by the MDR1 gene contributes to multidrug resistance (MDR) [1], and is already considered as one of the major obstacles to successful cancer chemotherapy [2, 3]. The MDR1 phenotype is commonly observed as the escape from chemotherapy of leukemic and breast cancer, and in kidney and colon cancer cells that overexpress Pgp at baseline, and are therefore intrinsically resistant to chemotherapy [4]. The discovery two decades ago that verapamil, trifluoperazine, cyclosporin A (CsA) and certain CsA analogues can contribute to the sensitization of resistant cancer cells to chemotherapy by competitively inhibiting Pgp transport triggered research into chemosensitizers (also termed MDR-reversal agents) [4–7]. Although disappointing results have been obtained with the first generation of reversal agents due to dose-limiting toxicity and other side effects, three recent randomized trials have confirmed the clinical potential of this approach. Indeed, significant benefits have been observed in patients treated with combinations of Pgp inhibitors and chemotherapy (see reference 4 for a review). However, effective and clinically applicable reversal agents remain to be discovered. The observation that numerous plant-derived dietary compounds modulate Pgp transport has led to interest in the possible use of natural compounds, or related chemicals, in combination with chemotherapy [8–14].

The goal of the present study was to assess whether cnidiadin, a furanocoumarin present in certain traditional Chinese medications and in *Tordylium apulum* (Apiaceae), a plant commonly used as a spice in Greek cooking with the name “*Kafkalithra*” can affect Pgp transport activity, and whether it can increase the uptake and cell toxicity of vinblastine (VBL) in a stable clone of MDR1-transfected Madin-Darby canine kidney (MDR1-MDCK) cells. In all experiments, cnidiadin (2'S,3'R-2' hydroxyisopropyl-3'hydroxyisopropyl-dihydroangelicin, Fig. 1) was tested versus verapamil or CsA that have both demonstrated clinical activity as reversal agents [4].

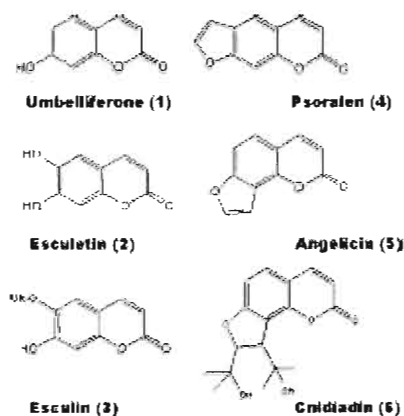


Fig. 1 Structures of the coumarins tested

To provide information on structure-activity relationships, cnidiadin was compared to angelicin (7,8-furano-1,2-benzopyrone), psoralen (6,7-furano-1,2-benzopyrone), umbelliferone (7-hydroxycoumarin), esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) and esculin (the 6-b-D-glucoside of esculetin). Esculin is present in large amounts in *Aesculum hippocastenum* seeds whose extracts are traditionally used in the EU to treat venous insufficiency. The results demonstrated that cnidiadin was the only tested coumarin that competitively inhibited Pgp transport activity in a significant manner. At 10  $\mu$ M, cnidiadin increased both the uptake of  $^3$ H-VBL and the cell toxicity of VBL on MDCK-MDR1 cells and decreased the IC<sub>50</sub> value of vincristine (VCR) in a human mutant carcinoma cell line overexpressing resistance to this vinca alkaloid. These results suggest that cnidiadin has potential as a chemosensitizer.

## Material and methods

### Cells and materials

MDR1-transfected Madin-Darby canine kidney (MDCK-MDR1) cells were a gift from Amanda Yancy (AstraZeneca Pharmaceuticals). They were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Stock cell cultures were maintained as monolayers in 75-cm<sup>2</sup> culture flasks in Glutamax with Earle's 5 ml of 100 mM solution of vitamins, 5 ml 100 mM sodium pyruvate, 5 ml · 100 non-essential amino acids and 2 mg gentamicin base. Cells were grown at 37 C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

Resistant KB/VCR cells resulted from long-term exposure of the parental sensitive KB human oral epi-dermoid carcinoma cell line to VCR. Wild-type KB (ECACC, Salisbury, UK) and mutant KB/VCR cells were grown on RPMI-1640 medium (GibcoBRL) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 g/ml streptomycin. All cells were grown at 37 C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

$^3$ [H]-VBL (11.3 Ci/mmol) was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Oakville, Ontario). CsA, SDZ 212-122, a diazine-CsA (dz-CsA) derivative and the monoclonal antibody (mAb) directed against CsA were gifts from Novartis Pharma Canada. The mAb Ab-2 directed against human MDR1 was purchased from NeoMarkers (Fremont, Calif.). The antimouse IgG horseradish peroxidase-linked whole antibody was purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, Pa.). All components of the medium were from Gibco (Gaithersburg, Md.) or Gibco-BRL (Paisley, UK). Umbelliferone, esculetin, esculin, angelicin and psoralen were purchased from Extrasynthèse (St Genay, France). R-123 and all other chemicals were from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Ontario).

### Isolation of cnidiadin

Cnidiadin, was isolated with a yield of 0.035% from dried leaves of *Tordylium apulum* collected during June 2002 near Delphes (Greece). A voucher specimen of the collected leaves has been deposited in the Laboratory of Pharmacognosie et Biotechnologies (Universite vergne) under the reference CBGTA-03. Cnidiadin was isolated, as described

previously [15], by ether extraction ( $n=3$ ) of powdered leaves, followed by TLC of the dried residue on silica gel 60 with *n*-hexane-ethyl acetate (5:1, v/v), and preparative TLC on silica gel with *n*-hexane-ethyl acetate [3:1, v/v]. The purity of the sample (more than 97%) was checked by RP-HPLC on a Spherisorb RP-18 S5 ODS-2 (20×4.6 mm ID) column. Analysis was conducted in gradient mode at a flow rate of 1 ml/min with a mixture of double-distilled water containing 3% glacial acetic acid (solvent A) and acetonitrile containing 3% glacial acetic acid (solvent B) as components of the mobile phase. The separation started with a mixture containing 6% B. The percentage of B was increased by 0.6% per min for 20 min, then by 3% per min for 5 min and by 5% per min for another 5 min. Cnidiadin was detected by fluorescence at 340/425 nm. The structure of cnidiadin has been previously determined [15]. An authentic sample of cnidiadin generously provided by Prof. Lin Rui-Chao (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing) was used as a reference.

#### R-123 accumulation in MDCK-MDR1 cells

MDCK-MDR1 cells were seeded at 150,000 cells per well in 24-well plates and cultured for 4 days at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. At confluence, cells were washed twice with HBSS (1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.4 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.83 mM MgSO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 25 mM D-glucose, pH 6.5) at 37 °C, then preincubated for 30 min at 37 °C with HBSS in the presence or absence of coumarins or of positive controls (CsA or verapamil) at the tested concentrations in DMSO at 0.1% (v/v). Finally, 20 μM R-123 was then added to each well, and the plates were incubated for 2 h at 37 °C. At this step, the accumulation of R-123 was stopped by washing the cells five times with cold PBS (150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4), and the cells were lysed with 0.1% Triton X-100 at room temperature. The fluorescence of cell lysates was measured with a SpectraMax Gemini spectrofluorometer (Molecular Devices) at a wavelength of 485 nm for excitation and 538 nm for emission.

#### Photoaffinity labeling with dz-CsA

Pgp photolabeling was assessed with the CsA analogue SDZ 212-122 which possesses a strong affinity for Pgp[6]. MDCK-MDR1 membranes (50 μg) isolated as previously described [6] were incubated for 1 h in the dark at 25 °C in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, containing SDZ 212-122 (0.1 μM) and verapamil (10 μM) or coumarins at the indicated concentrations, or DMSO at 0.1% (controls). The membranes were then crosslinked at 254 nm for 5 min at 4 °C with a Stratagene UV 2400 lamp (Stratagene, La Jolla, Calif.). Laemmli electro-phoresis buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) was added to the membrane samples, and the proteins were resolved by SDS-PAGE on 6.25% acrylamide-bisacrylamide (29.2:0.8) gels with a Mini-Protein II apparatus. The amount of dz-CsA linked to P-gp was immunodetected by Western blotting with a mAb against CsA. All experiments were performed at least three times. The intensities of the bands obtained from the photolabeling experiment were calculated with a personal densitometer SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.).

### Detection of Pgp in KB/VCR cells

Detection of Pgp in KB/VCR cells was done by Western blotting with Ab-2 mAb as previously described [16]. Briefly, proteins (50  $\mu$ g) from cell homogenates were resuspended in sample buffer and separated by SDS-PAGE on a 6.25% acrylamide-bisacrylamide (29.2:0.8) gel. Pgp was immunodetected by incubation using the mAb Ab-2 (1:1000, 2 h at room temperature) as primary antibody and horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG as secondary antibody. Detection was made with ECL reagents according to the manufacturer's instructions. To ascertain that similar amounts of protein were loaded in each gel, Western blots were always stained with Coomassie blue.

### [<sup>3</sup>H]-VBL accumulation in MDCK-MDR1 cells

MDCK-MDR1 cells were seeded at 150,000 cells per well in 24-well plates and cultured for 4 days at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. At confluence, the cells were washed twice with HBSS (1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.4 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.83 mM MgSO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 25 mM D-glucose, pH 6.5) at 37 °C. Cells were then preincubated for 30 min at 37 °C with HBSS containing DMSO (0.1% v/v) with or without cnidiadin in the range 0–100  $\mu$ M, or CsA in the range 0–10  $\mu$ M, or other coumarins at 10 or 100  $\mu$ M. In some experiments, cnidiadin at 0 or 100  $\mu$ M was tested in the presence or absence of indomethacin. [<sup>3</sup>H]-VBL (0.23  $\mu$ Ci) were then added at a concentration of 20 nM to each well, and the cells were further incubated for 2 h at 37 °C. [<sup>3</sup>H]-VBL accumulation was stopped by washing the cells five times with cold PBS (150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4). The cells were then lysed with 0.1% Triton X-100 at room temperature. The cell lysates were placed into scintillation vials and the radioactivity was counted.

### Cell proliferation assay

MDCK-MDR1 cells were seeded at 5000 cells per well in 96-well plates. VBL was added at 0.6  $\mu$ M, with or without cnidiadin (10  $\mu$ M) and cells were grown for 3 days at 37 °C under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell survival was assayed with a standard WST-1 assay using a previously described procedure [17]. In brief, 10  $\mu$ l WST-1 (a tetrazolium salt) were added to each well and the soluble formazan dye produced by metabolically active cells was monitored at 37 °C by reading the absorbance at 450 nm with a ThermoMax spectrophotometer (Molecular Devices).



## Results

### Cnidiadin promotes accumulation of R-123 in MDCK-MDR1 cells

To explore their capacity to inhibit Pgp transport activity, we first examined whether cnidiadin and other tested coumarins affected the uptake of R-123, a fluorescent Pgp substrate commonly used to investigate the activity of Pgp inhibitors. In a first series of experiments, all coumarins were tested at concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$  versus the vehicle (DMSO 0.1%). A strong increase in fluorescent dye was observed in MDCK-MDR1 cells treated with cnidiadin at 100  $\mu\text{M}$ , while no significant accumulation was detected when other coumarins were tested at this concentration or with cnidiadin at 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 2a). The potency of cnidiadin was then measured in relation to positive controls. CsA (10  $\mu\text{M}$ ) and verapamil (50  $\mu\text{M}$ ) increased R-123 uptake by 7.0- and 3.2-fold, respectively. Exposure to 100  $\mu\text{M}$  cnidiadin induced a higher accumulation of R-123 (8.9 times the control level). However, R-123 uptake was not affected when cnidiadin was used at 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 2b).

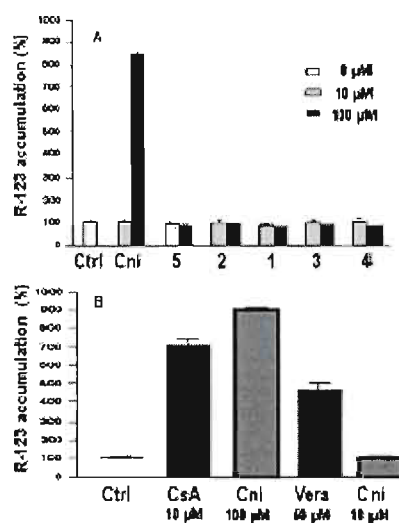


Fig. 2 Effect of cnidiadin and other coumarins on R-123 accumulation in MDCK-MDR1 cells. a The accumulation of R-123 in MDCK-MDR1 cells was measured over 2 h in the presence of 0, 10 and 100  $\mu\text{M}$  of cnidiadin (Cni), angelicin (5), psoralen (4), esculin (3), esculetin (2) or umbelliferone (1). b The R-123 accumulation promoted by cnidiadin at 100  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  was compared with that promoted by CsA (10  $\mu\text{M}$ ) and by verapamil (Vera, 50  $\mu\text{M}$ ). The results are presented as percentages and are the means from three independent experiments

## Cnidiadin inhibits Pgp photolabeling

To verify that cnidiadin competitively interacts with Pgp, we then examined whether cnidiadin inhibited the photolabeling of Pgp by SDZ 212-122, a photoactivable CsA analogue which possess a diazirine (dz) group at position 8. Membranes from MDCK-MDR1 cells were coincubated with the dz-CsA and cnidiadin, then the amount of Pgp linked to the CsA derivative was detected by Western blotting and the level of photolabeled Pgp was quantified by densitometry. In the range of concentrations 1–100  $\mu\text{M}$ , cnidiadin inhibited Pgp photolabeling in a strong and dose-dependent manner (Fig. 3a).

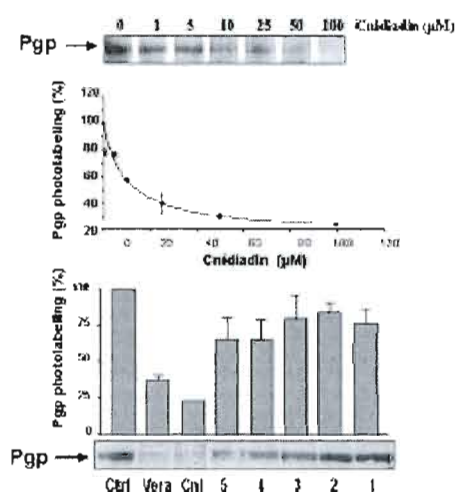


Fig. 3 Inhibition of P-gp photolabeling by cnidiadin and other coumarins. a Dose-dependent inhibition of Pgp photolabeling by cnidiadin. Membranes from MDCK-MDR1 cells (50  $\mu\text{g}$ ) were coincubated with dz-CsA (0.1  $\mu\text{M}$ ) and cnidiadin in the range 0–100  $\mu\text{M}$ , then crosslinked with UV light. Proteins were resolved by SDS-PAGE using 6.25% polyacrylamide gels. The residual amount of Pgp photolabeled by dz-CsA was determined by blotting with a CsA mAb as described in Materials and methods. The corresponding bands were analyzed by laser densitometry. The results are presented as a dose-response curve. b Inhibition of Pgp photolabeling by cnidiadin, verapamil and other coumarins. The inhibition of dz-CsA photolabeling by 100  $\mu\text{M}$  cnidiadin (6) was compared to inhibition by 10  $\mu\text{M}$  verapamil (Vera) or by 100  $\mu\text{M}$  angelicin (5), psoralen (4), esculin (3), esculetin (2) or umbelliferone (1). DMSO 0.1% was used as the control 100% photolabeling. The levels of photolabeled P-gp were estimated by laser densitometry. The results are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ) percentage of photolabeled Pgp measured in the presence of individual agents as compared to the control.

At 1, 10 and 25  $\mu\text{M}$ , the inhibition reached 9%, 59% and 68.5%, respectively (Fig. 3a). At 25  $\mu\text{M}$ , the inhibition promoted by cnidiadin (68.5%) was equivalent to that promoted by verapamil at 10  $\mu\text{M}$  (66%) (Fig. 3b). Although at 100  $\mu\text{M}$ , all coumarins inhibited the

photolabeling of Pgp by dz-CsA, cnidiadin appeared to be the only compound that efficiently competed with this CsA analogue for the binding of Pgp. Indeed, the highest degree of inhibition by a coumarins other than cnidiadin (34% for angelicin at 100  $\mu$ M) was markedly weaker than that promoted by cnidiadin at 10  $\mu$ M. Since at this latter concentration, cnidiadin did not induce significant accumulation of R-123, the inability of angelicin, psoralen, umbelliferone, esculin and esculetin to induce accumulation of R-123 was effectively related to their low capacity to bind Pgp.

The order of potency for inhibition of Pgp photolabeling of the tested coumarins was: cnidiadin >>> angelicin  $\cong$  psoralen > umbelliferone, esculin and esculetin. These results indicate that although the nuclear prenylation of the 1,2-benzopyrone nucleus favors the binding to Pgp, by itself, the additive nucleus does not confer a significant capacity to compete with SDZ 212-122. In this activity, the efficacy of cnidiadin appears due to the presence of the two isopropyl chains linked on the dihydroangelicin nucleus, rather than to the nucleus itself.

#### Cnidiadin increases the uptake of [ $^3$ H]-VBL in MDCK-MDR1 cells

Although it is a potent Pgp substrate, the small and water-soluble R-123 could not be used as a model to explore the potency of cnidiadin as a reversal agent. This point was evaluated by measuring the uptake of the radiolabeled anticancer agent [ $^3$ H]-VBL into MDCKMDR1 cells. In a first series of experiments, [ $^3$ H]-VBL uptake was assessed after a 120-min exposure to each coumarin at 0, 10 and 100  $\mu$ M. At 10  $\mu$ M cnidiadin increased [ $^3$ H]-VBL uptake, as did the other coumarins at 100  $\mu$ M (Fig. 4). These data confirmed that cnidiadin was the only tested coumarin exhibiting potency as a chemosensitizer.

In further studies, the potencies of cnidiadin and CsA were compared. In these experiments, cnidiadin was tested in the concentration range 0–100  $\mu$ M, and CsA in the concentration range 0–10  $\mu$ M. Both induced accumulation of [ $^3$ H]-VBL in a highly dose-dependent manner (Fig. 4b, c). The maximal uptakes were very close (7.2 times the control level for cnidiadin and 7.0 times for CsA) and the two dose-response curves showed similar profiles. However, 10  $\mu$ M of CsA were sufficient to cause the maximal accumulation while 100  $\mu$ M of cnidiadin were needed. Cnidiadin ( $IC_{50}$  26.4  $\mu$ M) thus appears a less-potent reversal agent than CsA ( $IC_{50}$  3.4  $\mu$ M).

However, cnidiadin at 10  $\mu$ M significantly interacted with Pgp and inhibited its transport activity (Fig. 4b). In humans, other members of the ABC superfamily have been implicated in MDR. These include the multidrug resistance protein-1 (MRP1), its homologues MRP2–6 that transport glutathione, glucuronate and sulfate-conjugated drugs, and the breast cancer resistance protein (BCRP) [4]. Certain dietary polyphenolics, such as quercetin, modulate the transport of VBL by different multidrug transporters [18, 19]. To evaluate how, in MDCK-MDR1 cells, cnidiadin-mediated [ $^3$ H]-VBL accumulation was specific to Pgp, we examined the effect of indomethacin, an inhibitor of MRP, on the uptake of [ $^3$ H]-VBL by cnidiadin. In the absence of cnidiadin, indomethacin did not affect VBL accumulation (Fig. 4d). This suggests that MDCK-MDR1 cells do not express MRP pumps or that activity of MRP proteins is not detectable in these cells using this technique. Since the only slight variation of accumulation was observed in the presence cnidiadin, a lack of inhibitory activity of cnidiadin against MRP proteins can be suggested.

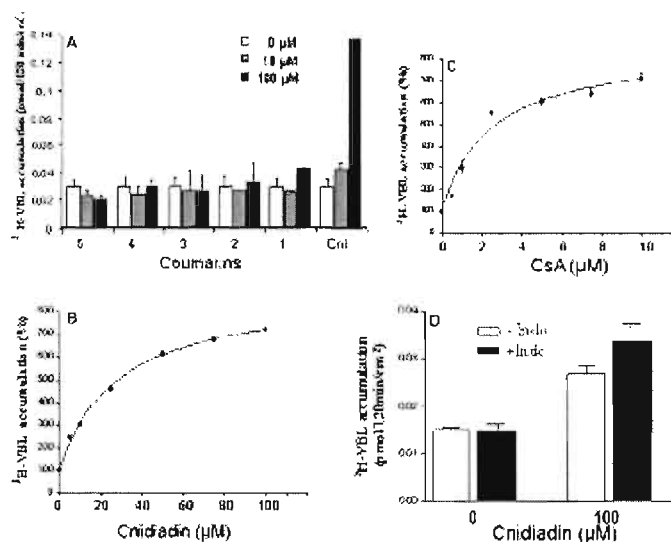


Fig. 4 Effect of treatment on [ $^3\text{H}$ ]-VBL uptake in MDCK-MDR1 cells. a Modulation of [ $^3\text{H}$ ]-VBL uptake by cniadiadin, angelicin (5), psoralen (4), esculin (3), esculetin (2) and umbelliferone (1). The uptake of VBL was measured after a 120-min exposure to each coumarin at 0, 10 and 100  $\mu\text{M}$  as described in Materials and methods. b Dose-response curve of the accumulation of [ $^3\text{H}$ ]-VBL following treatment with cniadiadin in the dose-range 0–100  $\mu\text{M}$ . c Dose-response curve of the [ $^3\text{H}$ ]-VBL accumulation following treatment with CsA in the dose-range 0–10  $\mu\text{M}$ . d Effect of cotreatment with indomethacin, an inhibitor of MRP, on the uptake of [ $^3\text{H}$ ]-VBL by cniadiadin. [ $^3\text{H}$ ]-VBL uptake was measured after a 120-min exposure of cells to solvent (DMSO 0.1%) or cniadiadin (100  $\mu\text{M}$ ) in the presence (white bars) or absence (black bars) of indomethacin. The data presented are the means the values obtained from three independent experiments performed in triplicate

Cniadiadin is a cytotoxic compound enhancing the cell toxicity of vinca alkaloids in resistant cells overexpressing Pgp

Further experiments were done to verify whether cotreatment with cniadiadin may enhance the cell toxicity of vinca alkaloids on resistant cells overexpressing Pgp. In these experiments, the vinca alkaloid (VBL or VCR) was used at its  $\text{IC}_{50}$ , and cniadiadin at 10  $\mu\text{M}$  or its  $\text{IC}_{50}$ . Cell toxicity was evaluated after a 72-h continuous exposure of the cells to the different chemicals singly or combined.

Assays were first conducted on MDCK-MDR1 cells. The level of resistance of this cell line to VBL was approximately 14. This value was calculated as the  $\text{IC}_{50}$  of a drug in the resistant cell line divided by that of the drug in the wild-type parental cell line (0.04  $\mu\text{M}$ ). When VBL was used alone at 0.6  $\mu\text{M}$ , it killed 57% of MDCKMDR1 cells. The proportion of killed cells reached 93% when VBL was used in association with cniadiadin at 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 5a). Because treatment with cniadiadin alone at 10  $\mu\text{M}$  killed about 50% of MDCK-MDR1 cells, it cannot be determined from these results whether the beneficial effect of cniadiadin

was the result of an additive cell toxicity or a reversal effect or both. However, they unambiguously show that 10  $\mu$ M cnidiadin enhanced the toxicity of VBL in MDCK-MDR1 cells by 163%.

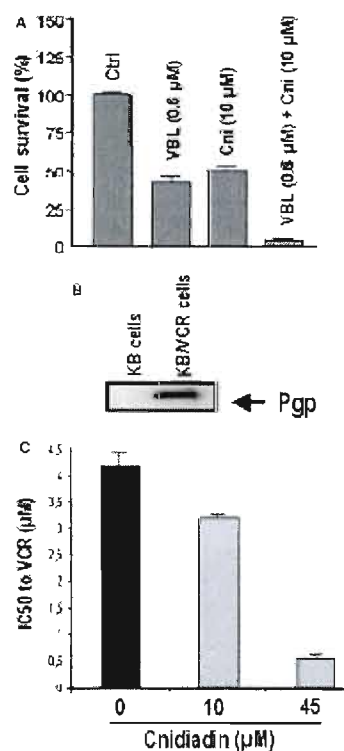


Fig. 5 Effect of a cotreatment by cnidiadin and vinca alkaloids on MDCK-MDR1 and KB/VCR cells. a Cnidiadin enhances the cell toxicity of VBL in MDCK-MDR1 cells. The survival of MDCKMDR1 cells exposed continuously to VBL (0.6  $\mu$ M), cnidiadin (10  $\mu$ M) or a combination of the two drugs for 72 h was evaluated with the WST-1 assay as described in Material and methods. DMSO (0.1%) was used as a control. The results presented are the mean  $\pm$  SD percentage survival in relation to control cells (100%). Values were obtained from three independent experiments. b Western blot analysis of Pgp expression in mutant human epidermoid carcinoma KB/VCR and wild-type KB cells. Proteins were separated on 6.25% polyacrylamide gels and transblotted onto a an Immobilon-P membrane. Pgp was detected with MDR Ab-2 mAb as described in Material and methods. c Cotreatment with cnidiadin sensitizes KB/VCR cells to VCR. IC<sub>50</sub> values of VCR were determined after a 72-h contact with cnidiadin at 0, 10 and 45  $\mu$ M. Cell toxicity was measured with the WST-1 assay as described in Material and methods. Values are the means  $\pm$  SD from three independent experiments

The MDCK-MDR1 cell line is not a cancer line. To evaluate whether cnidiadin has the potential to sensitize multiresistant human cancer cells to vinca alkaloids, we further tested the effect of cotreatment with cnidiadin/VCR on the human resistant cancer cell line (KB/VCR). This mutant epidermoid carcinoma line resulted from long-term exposure of

sensitive wild-type KB cells to VCR. It is highly resistant to VCR. Western blots performed with an antibody recognizing only the human MDR1 isoform (MDR mAb Ab-2), showed that this resistance is associated with expression of the MDR1 gene (Fig 5b). The level of resistance to VCR of the mutant cell line ( $IC_{50}$   $4.21 \pm 0.33 \mu M$ ) was established as 105. Interestingly, KB/VCR cells were much more resistant to cnidiadin ( $IC_{50}$   $43.47 \pm 0.27 \mu M$ ) than MDCK-MDR1 cells ( $IC_{50}$   $10 \mu M$ ). Notably, no cell toxicity was detected after exposure to  $10 \mu M$  cnidiadin. However, at this concentration, cnidiadin sensitized KB/VCR cells to VCR. Indeed, when cells were treated with VCR in combination with  $10 \mu M$  cnidiadin, the  $IC_{50}$  of VCR decreased from  $4.21 \pm 0.33 \mu M$  to  $3.18 \pm 0.17 \mu M$ , but was decreased to  $0.56 \pm 0.13 \mu M$  in combination with cnidiadin at  $45 \mu M$  (about the  $IC_{50}$ ) (Fig. 5c).

## Discussion

Furanocoumarins exist in many plants from the Rutaceae, Apiaceae and Leguminosae families. Some of these plants are sources of spices, herbal medicines, common vegetables (celery, parsley and parsnips), or beverages (grapefruit and other Citrus juices). The biological roles of furanocoumarins in their host plants are not fully understood. However, it is established that these chemicals are phytoalexins protecting plants from attack by insects, viruses and bacteria. Literature data show that certain of these dietary furanocoumarins may affect human health. Effects may be beneficial or deleterious. By blocking DNA adduct formation, the citrus coumarin, isopimpinellin, may exhibit chemopreventive activity [20]. Furanocoumarins from grapefruit mediate drug interactions and affect drug bioavailability and metabolism by modulating Pgp transport function and the activity of cytochrome P450 [12–14].

It has been reported that cnidiadin inhibits the proliferation of non-small-cell bronchial carcinoma cells by blocking the cell cycle in the G1 phase [15]. In this study, using MDCK-MDR1 cells as a model of cells expressing the human MDR1 phenotype, we tested cnidiadin for its capacity to (1) induce the accumulation of two Pgp substrates (the lipophilic cation R-123 and the radiolabeled anticancer agent [ $^3H$ ]-VBL), and (2) compete with a CsA analogue for binding to Pgp. In preliminary assays, cnidiadin was tested in comparison with three simple coumarins (umbelliferone, esculin and esculetin) and two furanocoumarins (angelicin and psoralen). CsA and verapamil were used as positive controls. Cnidiadin was the only tested coumarin capable of significantly inhibiting the extrusion of the lipophilic cation R-123 and the radiolabeled anticancer agent [ $^3H$ ]-VBL out of MDCK-MDR1 cells. At high concentrations ( $100 \mu M$ ), cnidiadin induced the accumulation of R-123 more efficiently than the two positive controls, and was slightly more potent than CsA in its ability to induce the accumulation of [ $^3H$ ]-VBL. These results indicate that, in contrast to other tested coumarins, cnidiadin can inhibit Pgp transport and may act as a reversing agent. Interestingly, in the dose range 0– $100 \mu M$ , cnidiadin substantially increased [ $^3H$ ]-VBL uptake in a dose-dependent manner. The maximal accumulation (7.2 times the control level) was close to the accumulation (7.0 times) promoted by  $10 \mu M$  CsA. At low concentrations, cnidiadin ( $IC_{50}$   $26.4 \mu M$ ) is however a less potent reversal agent than CsA ( $IC_{50}$ :  $3.2 \mu M$ ). Nevertheless,  $10 \mu M$  cnidiadin effectively induced the accumulation of [ $^3H$ ]-VBL in this cell-line.

Suppressing the expression of P-gp at either the transcriptional or protein level is a key approach to reverse MDR. Understanding the mechanism by which cnidiadin increases [ $^3\text{H}$ ]-VBL uptake was therefore important. The demonstration that this effect is due to a competition for the binding to Pgp was shown by a correlation between the dose-response curves of photolabeling inhibition and of [ $^3\text{H}$ ]-VBL accumulation. Consistent with a specific inhibition of Pgp efflux, [ $^3\text{H}$ ]-VBL uptake was not increased by an inhibitor of MRP in the absence of cnidiadin, and was only slightly increased when this inhibitor was used in combination with cnidiadin. These results support the hypothesis that, in MDCK-MDR1 cells, the accumulation of [ $^3\text{H}$ ]-VBL following treatment with cnidiadin is almost completely specific to a competitive inhibition of Pgp transport activity. Comparison of Pgp photolabeling inhibition by cnidiadin and the other tested coumarins shows that this effect is in a large part due to the two hydroxyisopropyl chains linked on the dihydroangelicin nucleus.

To further evaluate the potency of cnidiadin as a reversal agent, we tested its capacity to sensitize MDCKMDR1 and KB/VCR cells to vinca alkaloids. Our findings demonstrate that cnidiadin is a cytotoxic agent, and this is in agreement with previous findings in nonsmall-cell lung carcinoma (NSCLC) N6 cells, showing that cnidiadin is a cell-cycle inhibitor, blocking cells in the G1 phase [15]. The  $\text{IC}_{50}$  in NSCLC-N6 cells was established as 13.1  $\mu\text{g/ml}$  (39.8  $\mu\text{M}$ ) [15]. MDCKMDR1 cells appear much more susceptible to cnidiadin than N6 cells. Indeed, a single treatment with 10  $\mu\text{M}$  cnidiadin decreased the survival of this cell line by 50%. Used together with 0.6  $\mu\text{M}$  VBL, 10  $\mu\text{M}$  cnidiadin increased the cell toxicity of VBL by 163%. This finding indicates sensitization of this resistant cell line to VBL, but does not permit the part of additive cell toxicity in this effect to be determined.

To evaluate a possible benefit of cnidiadin in the treatment of human resistant tumors overexpressing Pgp, we then tested its capacity to enhance the cell toxicity of VCR in KB/VCR cells. This mutant human epidermoid carcinoma line that expresses the MDR1 gene exhibits high resistance (105-fold) to VCR and mild susceptibility to cnidiadin ( $\text{IC}_{50}$  43.5  $\mu\text{M}$ ). No cell toxicity was detected when cnidiadin was used at 10  $\mu\text{M}$  as a single agent. However, at this non-toxic concentration, cnidiadin decreased by 24.6% the  $\text{IC}_{50}$  value of VCR in KB/VCR cells. The beneficial effect of the cotreatment supports a synergism between VCR and cnidiadin. The exact mechanisms by which cnidiadin potentiates VCR, the toxicity of this furanocoumarin in normal cells and its specificity for cancer cells remains to be evaluated. However, our results clearly establish that cotreatment of KB/VCR cells with VCR and cnidiadin at non-toxic and toxic concentrations sensitized this resistant cell line to VCR.

Considering the important role of Pgp in the oral bioavailability of drugs [21], it is possible that cnidiadin in food or folk medications may play a complementary role against MDR by reversing barriers to drug availability. Indeed, Pgp is present in the intestine in the brush border of mature enterocytes where it pumps Pgp substrates from the enterocytes back to the intestinal lumen, preventing their absorption into blood. It has been reported previously that ingestion of furanocoumarins from grapefruit juice increases the bioavailability of Pgp substrates by partially inhibiting intestinal Pgp transport activity [22]. Inhibiting Pgp mediated drug efflux may have beneficial consequences, but may also contribute to drug interactions [22–25]. In vivo studies are thus needed to evaluate if ingestion of food or folk medicine containing cnidiadin has positive or deleterious effects. In conclusion, this study demonstrated that cnidiadin is a cytotoxic compound and a Pgp substrate capable, in vitro, of

competitively inhibiting the binding and efflux of drug by Pgp. The tumoricidal activity of this furanocoumarin, and its capacity to sensitize resistant cells overexpressing Pgp to vinca alkaloids suggest that diets and traditional preparations containing cnidiadin may contribute to (1) reverse multidrug resistance encoded by the MDR1 gene, and (2) increase the bioavailability of orally administered chemotherapeutic agents in humans. Due to its cell toxicity and weak reversal activity at low concentrations, clinical interest in cnidiadin as a reversal drug may, however, be limited.

**Acknowledgements** The authors thank Prof. Lin Rui-Chao (National Institute for the control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing) for the generous gift of cnidiadin standard to Chantal Barthomeuf. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Richard Beliveau and by INSERM to Chantal Barthomeuf.

## References

1. Gottesman MM, Pastan I (1983) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62:385–427
2. Trambas CM, Muller HK, Woods GM (1997) P-glycoprotein mediated multidrug resistance and its implications for pathology. *Pathology* 29:122–130
3. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22:7468–7485
4. Leonard GD, Fojo T, Bates SE (2003) The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 8:411–424
5. Didier A, Wenger J, Loo F (1995) Decreased uptake of cyclosporin A by P-glycoprotein (Pgp) expressing CEM leukemic cells and restoration of normal retention by Pgp blockers. *Anticancer Drugs* 6:669–680
6. Demeule M, Laplante A, Sepehr-Arae A, Beaulieu E, Averill-Bates D, Wenger RM, Beliveau R (1999) Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites. *Biochem Cell Biol* 77:47–58
7. Loo F, Tiberghien F, Wenandy T, Didier A, Traber R (2002) Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human MDR1 P-glycoprotein ABC transporter. *J Med Chem* 45:4598–4612
8. Romiti N, Tongiani R, Cervelli F, Chieli E (1998) Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Life Sci* 62:2349–2358



9. Jodoin J, Demeule M, Beliveau R (2002) Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochim Biophys Acta* 1542:149–159
10. Castro AF, Altenberg GA (1997) Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 53:89–93
11. Di Pietro A, Conseil G, Perez-Victoria JM, Dayan G, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Steinfels E, Jault JM, de Wet H, Maitrejean M, Comte G, Boumendjel A, Mariotte AM, Dumontet C, McIntosh DB, Go.eau A, Castanys S, Gamarro F, Barron D (2002) Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci* 59:307–322
12. Wang EJ, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW (2001) Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen. *Pharm Res* 18:432–438
13. Dwards DJ, Fitzsimmons ME, Schuetz EG, Yasuda K, Ducharme MP, Warbasse LH, Woster PM, Schuetz JD, Watkins P (1999) 6,7-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 65:237–244
14. Ohnishi A, Matsuo H, Yamada S, Takanaga H, Morimoto S, Shoyama Y, Ohtani H, Sawada Y (2000) Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *Br J Pharmacol* 130:1369–1377
15. Konas C, Chinou I, Loukis A, Harvala C, Roussakis C, Maillard M, Hostettmann K (1998) Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a nonsmall-cell bronchial carcinoma line. *Planta Med* 64:174–176
16. Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, Beliveau R (1997) P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J* 326:539–544
17. Barthomeuf C, Boivin D, Beliveau R (2004) Inhibition of HUVEC tubulogenesis by hederacolchiside A1 is associated with plasma membrane cholesterol sequestration and activation of the Ha-Ras/MEK/ERK cascade. *Cancer Chemother Pharmacol* 54:432–440
18. Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SP (2001) Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and ATPase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol Pharmacol* 59:1171–1180
19. Hsiu SL, Hou YC, Wang YH, Tsao CW, Su SF, Chao PD (2002) Quercetin significantly decreased cyclosporin oral bioavailability in pigs and rats. *Life Sci* 72:227–235
20. Kleiner HE, Vulimiri SV, Starost MF, Reed MJ, DiGiovanni J (2002) Oral administration of the citrus coumarin, isopimpinellin, blocks DNA adduct formation and skin tumor

initiation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 23:1667–1675

21. Evans AM (2000) Influence of dietary components on the gastrointestinal metabolism and transport of drugs. *Ther Drug Monit* 22:131–136

22. Dahan A, Altman H (2004) Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability—mechanism, extent and relevance. *Eur J Clin Nutr* 58:1–9

23. Yu DK (1999) The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug–drug interactions. *J Clin Pharmacol* 39:1203–1211

24. Verschraagen M, Koks CH, Schellens JH, Beijnen JH (1999) P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: the case of digoxin-verapamil. *Pharmacol Res* 40:301–306

25. Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, Brown MB, Guo W, Rossi SJ, Benet LZ, Watkins PB (1997) Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 62:248–260

## APPENDICE B

BLOOD-BRAIN BARRIERS: FROM ONTOGENY TO ARTIFICIAL INTERFACES:  
PART V: DRUG DELIVERY TO THE BRAIN: CHAPTER 19: THE BLOOD-BRAIN  
BARRIER: ROLES OF THE MULTIDRUG RESISTANCE TRANSPORTER  
P-GLYCOPROTEIN

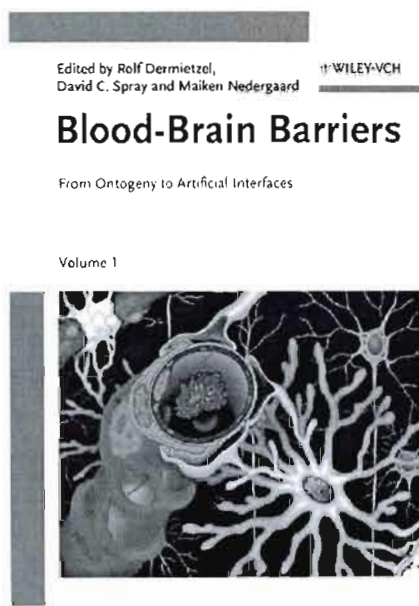
## RÉSUMÉ

La barrière-sang cerveau (BSC) est imperméable à de nombreuses substances véhiculées par le sang et est considérée comme une étape limitante dans la pénétration des médicaments au niveau du cerveau. L'unique morphologie de la BSC et la présence de ses transporteurs et récepteurs spécifiques sont responsables de la faible entrée des médicaments dans le système nerveux central (CNS). Plusieurs systèmes de transport assurant l'influx et l'efflux sont présents à la BSC pour maintenir l'homéostasie du CNS. Parmi eux, l'activité du transporteur à efflux de la résistance multiple (MDR1), la P-glycoprotéine (P-gp). La présence de la P-gp chez les cellules endothéliales de la BSC empêche significativement l'accumulation de plusieurs molécules hydrophobes au cerveau. L'objectif de cet article est d'offrir une vue d'ensemble des différentes évidences grandissantes démontrant le rôle clé de la P-gp au niveau des cellules endothéliales du réseau capillaire du cerveau.

Dermietzel, R. / Spray, D. C. / Nedergaard, M. (eds.)

**Blood-Brain Barriers**

From Ontogeny to Artificial Interfaces



WILEY-VCH  
Dermietzel  
1. UK  
C. Grössl

K+V Fotosatz GmbH  
Beerfelden  
22.11.2005

**Part V**  
**Drug Delivery to the Brain**

*Blood-Brain Interfaces: From Ontogeny to Artificial Barriers.*

Edited by R. Dermietzel, D.C. Spray, M. Needergard

Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ISBN: 3-527-31088-6

## 19

**The Blood-Brain Barrier:****Roles of the Multidrug Resistance Transporter P-Glycoprotein**

*Sandra Turcotte, Michel Demeule, Anthony Régina, Chantal Fournier, Julie Jodoin, Albert Moghrabi, and Richard Béliveau*

## 19.1

**Introduction**

For the brain, the blood-brain barrier (BBB) formed by the brain capillary endothelial cells (BCEC) is considered to be the major route for the uptake of endogenous and exogenous ligands into the brain parenchyma [1]. The EC of brain capillaries are closely sealed by tight junctions and constitute a continuous endothelium. Moreover, brain capillaries possess few fenestrae or endocytic vesicles as compared to the capillaries of other organs [1–3]. BCEC are surrounded by astrocytes, pericytes, microglial cells and by the extracellular matrix. The close association of BCEC with the astrocyte foot processes and the basement membrane of capillaries is important for the development and maintenance of the BBB properties that permit tight control of the blood-brain exchange of molecules [1–4].

The restrictive nature of the BBB is due, in part, to the tight junctions that prevent significant passive movement of small hydrophilic molecules between blood and brain. Nutrients such as glucose and amino acids penetrate into the brain via transporters, whereas uptake of larger molecules, including insulin and transferrin, occurs via receptor-mediated endocytosis [5, 6]. Among the factors controlling the passive entry of drugs into the CNS, lipid solubility is the predominant element because of the lipidic nature of cell membranes [7]. The overall hydrophilic/lipophilic balance of a molecule appears to be a better predictor of BBB permeability than the octanol/buffer partition coefficient. Molecular size, to which the rate of solute diffusion is inversely related, also appears to be relevant for hydrophilic compounds, but does not significantly influence the BBB permeability of lipophilic compounds. Aside from passive diffusion through lipid membranes, the binding of molecules to plasma proteins, ionisation at physiological pH ( $pK_a$ ), affinity and capacity of transport systems and potential BBB/cerebral metabolism are also important for entry into the brain. There are also an increasing number of studies showing that the activity of the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp) at the BBB prevents significant accumulation of many hydrophobic molecules or drugs in the CNS [8, 9].

## 19.2

### The Multidrug Transporter P-Glycoprotein

Almost two decades ago, Juliano and Ling showed that “Drug-resistant Chinese hamster ovary cell membranes possess a carbohydrate-containing component of 170000 daltons apparent molecular weight which is not observed in wild type” [10]. They were the first to demonstrate that overexpression of a glycoprotein they called P-glycoprotein (P for permeability) was responsible for pleiotropic resistance of tumor cells against a wide variety of chemotherapeutic agents. Thus, the development of simultaneous resistance to multiple drugs (MDR) that occurs after selection for resistance to a single agent mimics the MDR of human tumors treated with chemotherapy. Therefore the ATP-dependent efflux pump of anticancer drugs, P-gp, is one of the main causes of failure in chemotherapy. P-gp is a member of the ATP-binding cassette (ABC) group of transporters which represent the largest family of transmembrane proteins. They are found in all prokaryotic and eukaryotic cells. The vast majority of ABC proteins are active transporters requiring ATP hydrolysis to provide a driving force to translocate substrates against a concentration gradient across cell membranes. The first ABC transporter was sequenced more than 20 years ago [11]. Proteins are classified as ABC transporters based on the sequence and organization of their ATP-binding domains, also known as nucleotide-binding folds (NBFs). The NBFs contain characteristic motifs (Walker A and B motifs), which are found in all ATP-binding proteins [12]. Some 48 members of the ABC superfamily have been described in humans [13, 14]. They are divided into seven families (ABC A–G). The standard nomenclature, developed by the Human Genome Organization, is available at <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc>. Three of the ABC subfamilies (C, B, G) contain transporters known to express significant transport activity in the BBB and in the blood-cerebrospinal fluid barriers (BCSFB): P-gp (ABCB1), MRP (ABCC1, 4, 5, 6) and BCRP (ABCG2). These play a pivotal role in the brain barrier by functioning as active efflux pumps.

#### 19.2.1

##### P-gp Isoforms

Among the three efflux protein families known to have activity at the BBB, Pgp is one of the important ones identified at the BBB. It has been proposed that P-gp plays an important role at the BBB in limiting the entry of many drugs into the brain [15, 16]. The expression of P-gp in human BBB endothelial cells was first described by Cordon-Cardo et al. and Thiebaut et al. in 1989 [17, 18]. P-gp is encoded by the *MDR1* gene in humans and by *mdr1a* and *mdr1b* in rodents and is associated with the MDR phenotype [17]. P-gp encoded by *MDR2* in humans or by *mdr2* in rodents does not play an important role in the transport of drugs [19].



Mice genetically deficient in the *mdr1b* gene or in both *mdr1a* and *mdr1b* genes have normal viability. However, they show an accumulation of various drugs in the brain and other tissues, indicating that P-gp may act as a guardian by preventing the passage and accumulation of many drugs in the brain [9, 20, 21]. Moreover, it was shown that P-gp could limit the access of naturally occurring molecules, such as the glucocorticoid cortisol, to the mouse and human brain, particularly to the hippocampal area [22, 23].

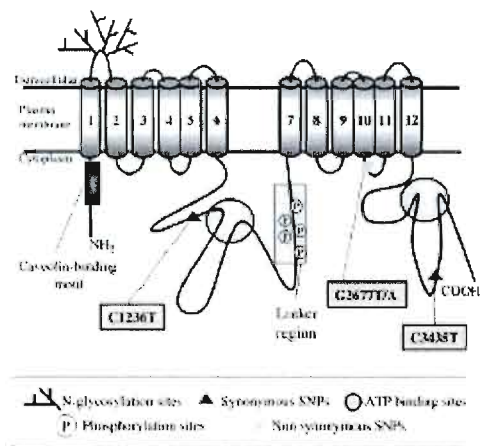
### 19.2.2

#### Structure

The P-gp human product of *MDR1* has 1280 residues whereas the mouse proteins *mdr* or *mdr3* have 1276 residues. A model for the structure of P-gp has been proposed based on the amino acid sequences (Fig. 19.1). In this model, two homologous halves (43% homology between the cDNA sequences) comprise each membrane transporter. Each half contains six alpha-helix transmembrane-spanning segments (TMs), for a total of 12 TMs. One cytoplasmic domain containing an ATP-binding site is also found on each half of the molecule. Phosphorylation sites have been identified in the linker region between the two halves of MDR1 in human [24] and two to four glycosylation sites have been described in the first extracellular loop between TM1 and TM2. Thus, the variability in the measured molecular weight of P-gp (150–180 kDa) is presumably due to different levels of P-gp glycosylation between species and tissues [24–26].

Using different biochemical approaches, various oligomeric states have been reported for P-gp, depending on the tissue and cells employed [27, 28]. Electron microscopy and computer models proposed that association between the TMs of P-gp leads to the formation of a pore with a funnel-shape across the membrane [29]. In this 3-D model, the protein viewed from the extracellular side has a diameter of about 10 nm surrounding a central pore of 5 nm diameter. The opening of this pore is narrowed inside the membrane by the nucleotide-binding domain of the protein. A rearrangement of the human P-gp TMs in the presence of different substrates or as a result of ATP hydrolysis has also been proposed [30–34]. From their studies, Loo and Clarke proposed a number of amino acid residues that could be involved in the interactions of, and thus the binding domains for, various P-gp substrates. Data obtained with transport measurements of fluorescent substrates and photoaffinity labeling studies support the existence of different binding sites for P-gp substrates, inhibitors or modulators [35, 36]. Recently, a crystallographic structure of P-gp has been reported which demonstrates that, upon binding ATP, the TMs undergo a reorganization in compact domains [37]. In addition, models representing two different functional states of P-gp (nucleotide-free, nucleotide-bound) have been proposed for the conformational rearrangement of TMs [38]. Despite the voluminous data on P-gp interactions with its

ligands, the direct structure-activity relationships (SAR) of P-gp remains to be clearly established. Better development of the SAR, which would increase the understanding of the pharmacological and physiological significance of P-gp, could eventually help in the prediction of drug entry into the brain through the BBB.



**Fig. 19.1** Schematic representation of P-gp. The P-gp secondary structure, embedded in the cell membrane, is presented. P-gp possesses 12 transmembrane domains; and N-glycosylation, phosphorylation and ATP-binding sites are also indicated. The most common nonsynonymous polymorphisms, which induce encoded amino acid changes, and synonymous polymorphisms, which cause a silent mutation, are also shown.

P-gp interactions with its ligands, the direct structure-activity relationships (SAR) of P-gp remains to be clearly established. Better development of the SAR, which would increase the understanding of the pharmacological and physiological significance of P-gp, could eventually help in the prediction of drug entry into the brain through the BBB.

## 19.2.3

**P-gp Substrates**

The first molecules identified as P-gp substrates were generally from natural sources, either plants or microorganisms. Many drugs are transported by P-gp and their accumulation in the brain is limited (Table 19.1). Vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, anthracyclines and taxanes are among the anticancer agents known to be transported by P-gp [39–41]. Increasingly, molecules other than anticancer agents have been identified as P-gp substrates. For example, P-gp transports cardiac drugs, Ca<sup>2+</sup> channel blockers, HIV protease inhibitors, immunosuppressive agents, fluorescent dyes and cyclic and linear peptides [40–43]. In

**Table 19.1** Substrates of P-gp.

Compound	Ref.	Compound	Ref.
<i>Anticancer agents</i>		<i>Ca<sup>2+</sup> channel blockers</i>	
Actinomycin D	178	Diltiazem	179, 180
Anthracyclines	181	Mibefradil	182
Colchicine	183	Verapamil	184–187
Daunorubicin	178	<i>Fluorescent dyes</i>	
Dexamethasone	82, 188, 189	Rhodamine 123	191
Docetaxel	190	Hoechst 33342	35, 36
Doxorubicin	192, 193	Calcein-AM	195, 196
Etoposide	194	Tetracycline	197
Mitomycin C	178	Tetraphenylphosphonium	198
Paclitaxel (taxol)	178	Ramosetron	202
Tamoxifen	199–201	<i>HIV protease inhibitors</i>	
Vinblastine	178, 203	Amprenavir	206
Vincristine	178	Indinavir	209, 210
<i>Immunosuppressive agents</i>		Saquinavir	209
Cyclosporine A	57, 204, 205	Ritonavir	213
Rapamycin	207, 208	<i>Bioactive peptides</i>	
Sirolimus	211	Adrenorphin	48
Tacrolimus	212	Endomorphin 1 and 2	48
<i>Others</i>		Somatostatin	49, 218
Opioids (morphine)	219, 220	β-Amyloid	87
Erythromycin (antibiotic)	222, 223	<i>Cardiac drugs</i>	
Okadaic acid	225	Digoxin	214, 215
Steroids	44, 227	Quinidine	178, 216
Aldosterone	44, 228	Digitoxin	217
Cortisol	23, 44	Substance P	49
Corticosterone	229	<i>Toxic peptides</i>	
Glucocorticoids	44, 230	Valinomycin	221
Progesterone	44	Gramicidin D	224
<i>Sphingomyelin</i>	231	<i>Cytokines</i>	
Lovastatin	226	Interferon-γ	45, 46
(lipid-lowering agent)		Interleukin-2 and -4	47

addition to xenobiotics, various endogenous substrates for P-gp have been identified in normal tissues, including several steroids such as cortisol, corticosterone, progesterone and aldosterone [23, 44]. Also, cytokines (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ ) and bilirubin have also been shown to be transported by P-gp [45–47]. Recently, the transporter has been shown to have high affinity for endogenous bioactive peptides, such as adrenorphin, endomorphin 1 and 2, somatostatin and substance P [48, 49].

Studies have shown that molecular weight (MW), surface area, aromaticity, amphiphilicity, proton basicity and H-bond accepting are important in determining P-gp substrate specificity [50–52]. Recently, it was proposed that P-gp substrate specificity could be approximated by three rules obtained from the MW, the H-accepting capacity (given by the Abraham's  $\beta$  coefficient) and from the ionization which is represented by the acid and base  $pK_a$  values of compounds. Thus, compounds with an Abraham's  $\beta$  coefficient  $\geq 8$  (approximately the total number of N and O atoms),  $MW > 400$ , and  $pK_a > 4$  are likely to be P-gp substrates, whereas compounds with  $(N + O) \leq 4$ ,  $MW < 400$  and  $pK_a < 8$  are likely to be non-substrates [53]. The application of this model could be useful in absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) profiling of new drugs. However, since P-gp possesses multiple binding sites and complex mechanisms for substrate recognition and transport, SAR models remain difficult to develop. The prediction of P-gp substrate specificity is influenced by several factors, including the types of assays used, the confusion between P-gp substrates and inhibitors and the binding possibilities with other targets such as cytochrome P450 3A4 [43, 53].

Reversal agents are molecules that restore sensitivity to anticancer agents in drug-resistant cancer cells by inhibiting the transport activity of P-gp. Three generations of these compounds have been used so far (Table 19.2). For example, calcium channel blockers, calmodulin antagonists, quinolins, steroids, immunosuppressive agents, antibiotics and detergents are reversal agents known in the first generation [54–56]. However, most of these agents produce significant toxicities when used at concentrations sufficient to inhibit P-gp. Several of these compounds are themselves substrates for P-gp and for other transporters. Among them, cyclosporin A (CsA) and verapamil were most often employed but cannot be used safely for MDR reversal at the dosage required. This led to the development of second-generation P-gp modulators, such as SDZ PSC 833 (valspodar), a CsA analogue [57]. Most of these agents have the same pharmacological properties as the original molecules but with less toxicity. In spite of their efficiency, many characteristics limit their clinical usefulness. It has been demonstrated that these compounds can significantly inhibit the metabolism and excretion of cytotoxic agents [58]. The high toxicity associated with this side-effect requires a reduction of chemotherapeutic doses in clinical studies [58]. Also, several second-generation P-gp modulators are themselves often substrates for cytochrome P450 3A4 enzyme or other transporter proteins such as MRP1 [59, 60]. These compounds are in competition with the cytotoxic agent for transport by the pump, giving an unpredictable pharmacokinetic interaction.

**Table 19.2** Modulators of P-gp properties.

Modulator	Ref.	Medical use/analogy/type <sup>a)</sup>
<i>First-generation compounds</i>		
Cyclosporin A	57, 204, 205	Immunosuppressive
Nifedipine	232	Calcium channel blocker
Progesterone	233	Progestative
Quinidine	178, 216	Antiarrhythmic
Quinine	234, 235	Antimalarial
Tamoxifen	199, 200	Antioestrogen
Verapamil	184, 185	Calcium channel blocker
<i>Second-generation compounds</i>		
Valspodar (PSC833)	28, 236	Cyclosporin A
Cinchonine	234	Quinine
Dexniguldipine	237	Nifedipine
Dexverapamil	238, 239	Verapamil
<i>Third-generation compounds</i>		
Tariquidar (XR9576)	240	Anthranilamide
Zosuquidar (LY335979)	241, 242	Difluorocyclopropyldibenzosuberane
ONT-093	243	Substituted diacylimidazole
Tariquidar (XR9576)	244	Anthranilic acid derivative
Biricodar (VX710)	60, 245	Piperidine carboxylate
Elacridar (GF120918/GG918)	246	Acridone carboxamide
<i>Natural compounds</i>		
Curcumin	63	Polyphenol
Ginseng	85, 247, 248	Ginsenosides
Piperine	249, 250	Alkaloid (black pepper)
Catechines from green tea	66, 251	Polyphenols
Silymarin from milk thistle	252	Flavonoids
Garlic	253, 254	Organosulfur compounds

a) First-generation compounds: medical use. Second-generation compounds: analogy to first generation compound. Third-generation/natural compounds: type or chemical structure.

After disappointing results, a third generation of reversal agents was developed. These molecules aim to specifically inhibit P-gp function. These agents do not affect cytochrome P450 3A4 and were generally developed using SARs and combinatorial chemistry. Because they are noncompetitive inhibitors of the P-gp transporter, the use of this third generation of P-gp modulators permits a reduction in the dosage of chemotherapeutic agents.

The clinical efficacy of these reversal agents remains to be established, not only with regard to overcoming tumor resistance against chemotherapy, but also for other factors such as bypassing P-gp in the BBB. In recent years, several new approaches have been developed to reduce and inhibit MDR1/P-gp expression in cells. Among them, the use of monoclonal antibodies or immunotoxins against P-gp, antisense oligonucleotides and small interfering RNAs (siRNAs) has been investigated [61, 62].

Furthermore, natural products from dietary intake, such as curcumin ginsenosides and piperine, have been identified as inhibitors of P-gp and several flavonoids, such as quercetin and naringenin, are reported to modulate P-gp activity (Table 19.2) [63–65]. Moreover, we have also demonstrated that epigallocatechin gallate, the major polyphenol present in green tea, inhibits P-gp activity [66]. At the same time, much effort has gone into investigating and identifying new natural compounds that inhibit P-gp, reverse the MDR phenotype and sensitize cancer cells to conventional chemotherapy without toxicological effects. However, other studies are necessary to understand the mechanisms involved in P-gp modulation by these natural products and to explore their potential in chemoprevention.

### 19.3

#### Localization and Transport Activity of P-gp in the CNS

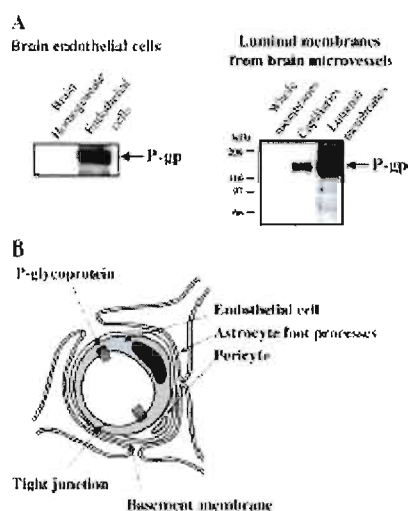
##### 19.3.1

##### Normal Brain

P-gp is found in many normal tissues with excretory function, including liver, kidney and small intestine [67, 68], and at blood-tissue barriers such as the BBB, blood-testis barrier and placenta [69]. As a result of its anatomical localization, P-gp is one of the most important transporters for drug disposition in the organism. It limits drug entry into the body after oral drug administration (entérocytes luminal membrane), it promotes drug elimination into bile and urine (hepatocyte canalicular membrane, kidney proximal tubule luminal cell membrane) and it limits drug penetration into sensitive tissues (brain, testis, fetal circulation).

The expression of P-gp in human BBB endothelial cells has been described in many studies, performed in various species (human, rat, mouse, cow, pig) [70–72] and indicates that the major site of BBB P-gp expression is at the luminal membrane of capillary endothelial cells (Fig. 19.2 A, left panel). Several reports have shown that P-gp could be also present in the brain parenchyma. For example, *in vitro* P-gp expression and activity have been demonstrated in primary astrocyte rat brain cultures [73, 74] and in microglia [75]. *In vivo*, a recent study examined Pgp distribution, using confocal microscopy on rat brain sections and indicated that this transporter was preferentially expressed in the endothelial component but was also present in astroglial cells [76]. Another team observed that the P-gp pattern of expression in human and primate brain was the same as that seen for the astrocyte marker GFAP [77, 78]. Based on these immunofluorescent studies, a model of MDR in brain was proposed where P-gp is localized on astrocyte foot processes at the antiluminal side of the human BBB. More recently, this group published results where P-gp expression was found both in astrocytes and in endothelial cells of healthy primate brain [79]. In our laboratory, a study indicated that P-gp was strongly enriched in the positive endothelial cell fraction from brain and was absent from the negative fraction in which the glial fibrillary

## 19.3 Localization and Transport Activity of P-gp in the CNS 439



**Fig. 19.2** P-gp expression at the BBB. (A) Left panel: Detection of P-gp in homogenates and in endothelial cells (EC) isolated from brain using magnetic cellsorting beads. Right panel: Proteins from whole membranes, brain capillaries and endothelial luminal membranes were separated by SDS-PAGE and immunodetected with mAb P-gp (C219) antibody. (B) Schematic view of P-gp at the BBB. EC are sealed by continuous tight junctions and surrounded by a basal lamina. Pericytes are present at the periphery of vessels. Astrocyte foot processes are in close contact. P-gp is present in the luminal membranes of the brain vascular endothelium and impedes brain penetration by lipophilic substances.

acidic protein (GFAP), an astrocyte marker, was present [80]. It was also shown by RT-PCR analysis that the *mdr1a* gene was preferentially expressed in this enriched EC fraction from the brain. At the subcellular level, our findings demonstrated that the P-gp was localized in isolated luminal membranes from the brain vascular endothelium in rat [81] (Fig. 19.2 A, right panel).

Overall, data obtained for most studies suggest that P-gp expressed in the capillary endothelial cells of the BBB restricts the CNS accumulation of many drugs, including chemotherapeutic agents (Fig. 19.2 B). This protective action of P-gp has been demonstrated using *mdra* knockout mice [82]. In addition to the expression of P-gp at the BBB, there have been a few reports of the expression and functional activity of P-gp in the choroid plexus [76, 83, 84]. P-gp was localized at the subapical side of choroid plexus epithelia and vectorial transport experiments performed on cultured rat choroid plexus showed an apically directed efflux function for P-gp, suggesting a role in preventing the export of certain substances out of the CSF, as opposed to its action at the BBB. More studies are needed to understand and characterize the role of P-gp at the choroid plexus.

### 19.3.2

#### **Brain Diseases**

The expression and activity of P-gp in the CNS plays an important role in the disposition and efficacy of pharmacological agents for brain diseases, such as brain tumors, epilepsy or HIV-associated dementia [85, 86]. In addition, P-gp also seems to play a key role in the etiology and pathogenesis of certain neurological disorders, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases [87, 88]. In brain tumors, progress in clinical treatment has been slow and one of the major problems impeding treatment of these tumors is their weak response to anticancer drugs. In fact, brain tumors are known to develop MDR quite rapidly. Furthermore, gliomas are characterized by their infiltrative pattern of growth and it is likely that the blood-brain area in the tumoral periphery, which often escapes surgical intervention, possesses a totally functional BBB. The low response to chemotherapy may also depend on tumor blood flow, the integrity of the blood-tumor barrier and an inherent or acquired MDR phenotype in cancer cells [89]. As P-gp plays a major role in the defense of the organism against xenobiotics at the BBB [9], the determination of P-gp levels in brain tumors and peritumoral tissue is crucial for evaluating the long-term efficacy of chemotherapy. P-gp has been detected in endothelial cells from newly formed microvessels of gliomas [90–92], suggesting that, despite the leaky nature of the vasculature of gliomas, angiogenic vessels have maintained some of the restrictive capacities of the BBB.

#### 19.3.2.1

##### **Malignant Brain Tumors**

We have reported that the P-gp expression levels detected by Western blot in various human malignant brain tumors (low-, high-grade gliomas) are similar to the levels of P-gp expression found in normal brain [93]. This is in agreement with previous studies which reported the presence of P-gp in resistant and partially chemosensitive glioblastomas by immunohistochemistry, using the monoclonal antibody C219 [94–96]. These results suggest that the poor response



of brain tumors to many anticancer drugs may be related to the presence of this efflux transporter in cell populations of the primary brain tumors and that P-gp may be considered as a negative factor when predicting the outcome for patients with brain tumors. These findings also suggest that P-gp expression is maintained in both low- and high-grade gliomas. Moreover, the widespread expression of P-gp in these tumors may reflect an intrinsic resistance to anticancer drugs.

Previous immunohistochemical analyses showed that most gliomas and, more specifically, endothelial cells within the gliomas, stained positively for MDR1 P-gp [91, 92]. These studies support the concept that clinical drug resistance may be caused by P-gp expression, not only in cancer cells but also in the capillary endothelial cells of brain tumors. The role of the BBB in the low efficacy of chemotherapy is still unclear. Alterations in the brain capillary ultrastructure have been described, leading to an increase in the microvascular permeability in gliomas. In contrast, it has been reported that the neovasculature of even high-grade tumors preserves partial BBB permeability properties at the cellular level [97] and that the BBB at the tumor periphery is still intact. In addition, a study indicated that P-gp, one of the best phenotypic markers of the BBB, is expressed at the same levels in all primary tumors as in normal brain, indicating that brain tumors retain an important characteristic of the BBB which restricts the brain uptake of chemotherapeutic agents. Thus the BBB, especially at the edge of tumors, remains a formidable obstacle for drug distribution to brain regions that have been infiltrated by neoplastic cells [98].

#### 19.3.2.2

##### **Brain Metastases**

Brain metastases occur in 20–40% of cancer patients and the estimated incidence in the United States is 170000 new cases per year [99]. Lung cancer (9.7–64.0%), breast cancer (2–25%) and melanoma (4–20%) are the most common primary sources of metastases to the CNS [100]. Strikingly, we found that brain metastases from melanomas and lung adenocarcinomas exhibit only 5% and 40%, respectively, of the P-gp levels found in normal brain [93]. Metastatic malignant melanomas are recognized for their poor response to chemotherapy, whereas some effects of chemotherapy have been observed for lung adenocarcinomas [101]. The low expression of P-gp in these brain metastases suggests that MDR mechanisms other than P-gp could be responsible for their poor response to chemotherapy. The lack of P-gp expression in primary lung tumors and corresponding brain metastases also indicates that these brain metastases do not acquire the levels of P-gp expression found in normal brain tissue.

## 19.3.3

**Expression of Other ABC Transporters at the BBB**

It has been reported that efflux transporters other than P-gp are also expressed in brain capillaries. For instance, members of the MDR-associated protein (MRP) family have been detected at the BBB. In humans, seven MRP homologues have been identified [102]. All members of the MRP family are distributed throughout most human tissues [103]. MRP1, which was first described in 1992, was immunodetected by Western blots in human and rat choroid plexus, but the presence of MRP1 in the EC of brain capillaries remains controversial [104]. In animal models, Western blot and RT-PCR analysis suggest that MRP1 is expressed in isolated rat brain capillaries, primary cultured rat, pig and cow BCECs and immortalized rodent BCECs [105–107]. However, in isolated human brain capillaries, no expression of MRP1 was observed by immunohistochemistry [108]. The canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT or MRP2) was principally detected in hepatocytes, intestine and kidney but was not detected in endothelial cells of rat brain capillaries by Western blot [109]. Recently, MRP1, -4, -5 and -6 were shown to be expressed in primary BCECs by RT-PCR analysis as well as in a capillary-enriched brain extract [110]. In addition, MRP mRNA levels appeared to be closely associated with resistance to etoposide, adriamycin and vincristine in human glioma cell lines derived from patients [111]. Recently, levels of MDR1 and MRP1–MRP4 mRNA were compared between normal brain tissue and malignant gliomas [112]. The expression of both MDR1 and MRP2 were similar in normal brain and tumors, whereas MRP1 and MRP3 expression increased with tumor grade. Therefore, some of the MRPs may also confer intrinsic MDR activity in human gliomas or in metastatic brain tumors.

## 19.3.4

**Subcellular Localization of P-gp**

P-gp was also found in a specialized microdomain of plasma membranes called caveolae. This P-gp expressed in caveolae was first identified in multidrug-resistant cells [113–115], where it appears to play an important role in drug resistance development [116, 117]. Caveolae are flask-shaped plasma membrane invaginations involved in many cellular events such as transcytosis, endocytosis, cholesterol transport and signal transduction [118]. A family of proteins called caveolins comprise the structural component of caveolae. Caveolin-1 and caveolin-2 are primarily expressed in adipocytes, endothelial cells, smooth muscle cells and type I pneumocytes [119], whereas caveolin-3 is expressed in muscle and glial cells [120, 121]. Caveolin-1 possesses two isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) whereas three isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) were reported for caveolin-2. MDR is a multifactorial process and recently an upregulation of caveolae and caveolar constituents, such as caveolin-1, -2 and glucosylceramide, was observed in different MDR cancer cells compared to their drug-sensitive counterparts [113, 114, 122, 123].

Localization of P-gp in caveolae has been also shown in the brain by different means. First, using a detergent-free method for caveolae isolation, our group showed the enrichment of P-gp, caveolin-1 and cholesterol in the low-density microdomains of human isolated brain capillaries and endothelial cells of an *in vitro* BBB model [115, 124]. Second, immunocytochemical analysis demonstrated the presence of P-gp in plasmalemmal vesicles of rat brain capillaries and in an immortalized rat brain endothelial cell line, RBE4 [125]. Then, Virgintino et al. [126] showed, by microscopy, that a large proportion of P-gp and caveolin-1 colocalize in the luminal compartment of the endothelial cells in human microvessels of the cerebral cortex. Besides cells, immunocytochemical analysis shows that, in astrocytes, a portion of P-gp is localized in caveolae [74] and colocalized with caveolin-1 [79].

In addition to the colocalization of some P-gp and caveolins in caveolae, our coimmunoprecipitation studies indicated that a population of P-gp molecules interacted with caveolin-1 in endothelial cells of the BBB [115, 124]. This coimmunoprecipitation was also reported in MDR cells [115, 127] and in astrocytes [74]. Similar to caveolin-1, caveolin-2 interacts with P-gp; and these three proteins form a high molecular mass complex at the BBB [124]. Oligomeric forms of P-gp have been observed in MDR cells and brain capillaries [28, 128] and recent data suggest that P-gp oligomerizes through indirect interactions [129]. The involvement of caveolins in P-gp oligomerization remains to be investigated, as well as the possibility of other proteins interacting with P-gp, like actin, ezrin, radixin, moesin, calnexin, Hsp70 and Hsp90 beta [130–132].

P-gp contains in its N-terminal portion a consensus caveolin-binding motif present in many proteins known to bind the scaffolding domain of caveolin-1 (Fig. 19.1). Three related caveolin-binding motifs are known ( $\phi$ X $\phi$ XXXX $\phi$ ,  $\phi$ X $\phi$ XXXX $\phi$ XX $\phi$ ,  $\phi$ X $\phi$ XXXX $\phi$ XX $\phi$ , where  $\phi$  is a phenylalanine, tyrosine or tryptophan residue and X is any amino acid residue) [133]. The scaffolding domain of caveolin-1 regulates signaling molecules localized in caveolae such as eNOS, protein kinase C, insulin receptor, EGF and VEGF receptors [134, 135]. In the case of P-gp, mutation of its caveolin-binding motif decreases the interaction between P-gp and caveolin-1 and increases P-gp transport activity, indicating that caveolin-1 negatively regulates P-gp activity [124]. Moreover, overexpression of caveolin-1 in drug-resistant cells expressing P-gp causes a reduction of P-gp activity and in the cells become drug-sensitive, supporting the hypothesis that caveolin-1 inhibits drug transport by P-gp [127].

## 19.4

### Polymorphisms of P-gp

#### 19.4.1

#### MDR1 Polymorphisms at the BBB

In recent years, researchers have started to investigate the molecular mechanisms underlying inter-individual differences in the pharmacological effects of drugs. Genetic variations in drug transporters have received particular interest since they are among the factors determining the pharmacokinetic profile of drugs. Efforts have also been made to identify genetic variations of the human MDR1 (ABCB1).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) result in a single nucleotide substitution and possibly a change in the encoded amino acid. More than 40 SNPs and insertion/deletion polymorphisms in the ABCB1 gene have been reported. MDR1 gene SNPs are located in the coding region and in the noncoding region, including the core promoter region and the intron-exon boundaries [136–138]. The most common allelic combinations of MDR1 SNPs, which encode no amino acid changes, are synonymous polymorphisms at exon 12 (C1236T) and exon 26 (C3435T) and nonsynonymous polymorphisms (encoding amino acid changes) at exon 21 (G2677T). The localization of these major SNPs is shown in the schematic representation of P-gp (Fig. 19.1). Allele frequencies vary widely in MDR1 SNPs, particularly between populations of African descent and other ethnic groups. A large discrepancy is observed in these populations with an average of 18% and 48% frequencies, respectively, for the T allele of the three common allelic combinations of MDR1 SNPs (Table 19.3). Moreover, the segregation observed in the African American population consistently presents different, specific genetic combinations of MDR1 SNPs (haplotype) [136, 138, 139]. Consistent with wild-type allelic frequency in individuals of African origin, epidemiologic studies have observed a lower incidence of ulcerative colitis in Africans as compared with Caucasians [140]. It was suggested that the higher frequency of the wild-type allele (CC) in the African population for exon 26

**Table 19.3** Most frequent allelic combinations of MDR1 genetic variations [136–138]. CA=Caucasian; AA=African American; AS=Asian American; ME=Mexican American; PA=Pacific Islander.

Exon	SNP	Allele frequency (%)				
		CA	AA	AS	ME	PA
12	C1236T	35–46	21	68	45	57
21	G2677T	42–46	10	45	40	36
21	G2677A	2–10	0.5	6–22	0	36
26	C3435T	48–56	20–23	40–49	50	50

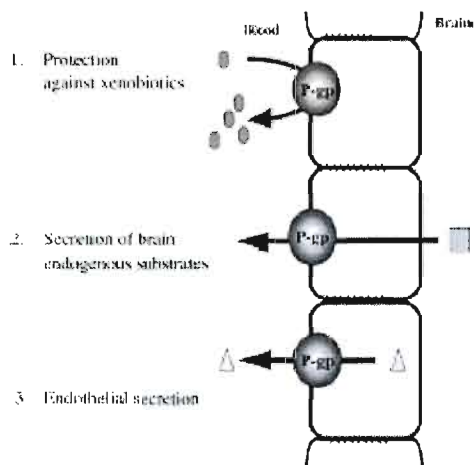
(C3435C) SNPs may have resulted in a selective advantage against intestinal tract diseases [141]. There have also been no cases of neurotoxicity reported after treatment with ivermectin for the prevention of onchocerciasis in Africa, even though this drug causes neurotoxicity in animals with low P-gp expression [139, 142]. Thus, it has been demonstrated that some MDR1 polymorphisms have an impact on P-gp expression and function. The introduction of nucleotide changes in highly conserved regions of the MDR1 gene has a major impact on P-gp function and expression, in comparison with a nucleotide substitution introduced in less conserved regions of the gene [40, 143–145].

#### 19.4.2

#### **MDR1 Polymorphism and Brain Pathologies**

At the BBB, impairment of P-gp function or altered P-gp expression level has been associated with severe neurotoxic side effects following administration of drugs or xenobiotics [146–148]. The SNPs in exon 26 (C3435TT or CT) genotypes are associated with low P-gp expression in the BBB in comparison to the CC genotypes references. A five-fold increased risk for developing Parkinson's disease was found in exon 26 (C3435T) heterozygous (T) and homozygous (TT) patients exposed to pesticides [88, 149]. Children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) with the C3435TT or CT genotypes demonstrated a better response to chemotherapeutic drugs (e.g. etoposide, vincristine, doxorubicin), thus reducing the risk of CNS relapse [150]. Furthermore, the nonsynonymous G2677T SNPs in exon 21, combined with the synonymous C3435T SNPs in exon 26, increased the neurotoxicity of the immunosuppressive drug tacrolimus in liver transplant patients [151]. Patients with resistance to epileptic drugs have shown a higher frequency of the C3435CC genotype than the C3435TT SNPs. The well known C3435T polymorphism is silent (no amino acid changes) and raises the possibility that the polymorphism is not in itself causal but that different mutational groups (SNPs) forming different haplotypes in a consistent network are possibly the causal events [152]. Thus, linkage disequilibrium of the C3435T SNPs with other SNPs has underscored the importance of understanding haplotypes.

Interstudy comparison of the polymorphic effects on P-gp expression and function requires extensive haplotype analyses [136–138, 153, 154]. This will also provide a powerful tool for predicting and optimizing drug therapy, particularly for drugs with narrow therapeutic indices where induction or inhibition of transporter function can have a tremendous impact on drug efficacy and safety [136, 138, 155–157].

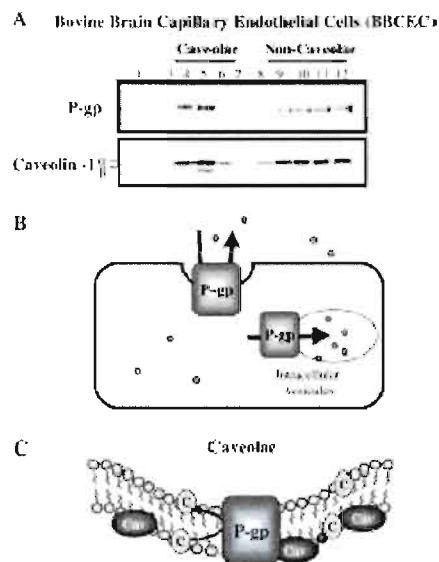


**Fig. 19.3** Roles of P-gp at the BBB. P-gp at the BBB could have different physiological roles such as: (1) protection against xenobiotics, (2) secretion of brain endogenous substrates and (3) endothelial secretion.

## 19.5

### Role of P-gp at the BBB

In brain capillaries, P-gp appears to play an important role in preventing many hydrophobic molecules from crossing the BBB and reaching the CNS. However, the exact physiological function of P-gp in the BBB is not completely understood. A growing body of evidence links P-gp to physiological roles distinct from its initially recognized function as a drug efflux system (Figs. 19.3 and 19.4).



**Fig. 19.4** Proposed roles of P-gp localized in caveolae.

(A) Low-density caveolae-enriched domains were isolated from BBCEC cocultured with astrocytes, using a carbonate-based fractionation method. Each fraction from a sucrose gradient was separated by SDS-PAGE and immunodetected using antibodies directed against P-gp (mAb C219) and caveolin. (B) Since cholesterol is important for P-gp activity, the localization of P-gp in enriched cholesterol microdomains (caveolae) contributes to decreasing intracellular drug concentrations by pumping drugs inside caveolar vesicles and increasing their elimination outside the cells. (C) P-gp mediates cholesterol redistribution from the cytosolic leaflet to the exoplasmic leaflet of the plasma membrane. C=Cholesterol; Cav=caveolin-1.

## 19.5.1

**Protection Against Xenobiotics**

Numerous reports provide functional evidence for P-gp-mediated drug efflux at the BBB. The interaction of drugs with P-gp in rat brain capillaries was demonstrated by photoaffinity labeling [158]. The generation of transgenic mice with a disruption of the *mdr1a* gene provided a pharmacological tool for the study of P-gp function in the BBB [9, 20]. These mice are viable, fertile and do not display obvious phenotypic abnormalities, indicating that this protein is not essential to their vital functions. However, P-gp substrates accumulate in the brains of these mice to a much greater extent than in wild-type animals and they are more sensitive to central neurotoxicity. For example, knockout mice are 50–100 times more sensitive to the neurotoxic effects of the pesticide ivermectin. The accumulation of this drug in brain tissue of *mdr1a*( $-/-$ ) mice was increased 80–100 times as compared to control mice. Recent application of in situ brain perfusion to wild-type and P-gp-deficient *mdr1a*( $-/-$ ) mice made it possible to assess the influence of P-gp on brain uptake of substrates without the potentially confounding differences in systemic pharmacokinetics upon P-gp distribution [159]. In summary, as indicated by Schinkel in 1999, P-gp appears to be a major efflux transporter at the BBB that acts as a guardian of the CNS by preventing the accumulation of many drugs in the brain [9].

## 19.5.2

**Secretion of Endogenous Brain Substrates and Endothelial Secretion**

In addition to its guardian role, P-gp is involved in the excretion of toxic compounds by renal proximal tubules and hepatic canalicular membranes [68, 69] and in the secretion of endogenous molecules from adrenal glands [160]. Thus, P-gp could fulfill a similar function in the BBB and be responsible for the secretion and/or excretion of brain-derived substances or metabolites into the blood (brain secretion). It could also be involved in the secretion of molecules from the endothelium itself (capillary secretion). In this respect, P-gp has been proposed to be involved in the release of neuroactive substances from the brain directly into the systemic blood following intracerebroventricular injection [161]. In addition, it has been demonstrated that  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) is transported across the plasma membrane of P-gp-enriched vesicles in an ATP- and P-gp-dependent manner, suggesting that  $A\beta$  might be an endogenous substrate for P-gp in brain [87]. Thus, a change in MDR1 function or expression might alter the clearance of  $A\beta$  from the brain and may contribute to cerebrovascular angiopathy. Since the accumulation of  $A\beta$  in the brain is a feature of Alzheimer's disease, the mechanism of  $A\beta$  transport opens new avenues in the understanding of Alzheimer's disease.



## 19.5.3

**Caveolar Trafficking**

Why P-gp is localized in caveolar microdomains remains to be established. However, several roles can be proposed for P-gp in these membrane microdomains, which are illustrated in Fig. 19.4. As mentioned, a portion of the P-gp localized in the brain capillary endothelial cells was found in caveolae microdomains (Fig. 19.4 A). It has been proposed that the P-gp localized in the caveolae of MDR cells might act to decrease intracellular drug concentrations by pumping drugs inside caveolar vesicles and increasing their elimination (Fig. 19.4 B). Different observations in MDR cells support this role of P-gp in caveolae: increase of caveolae and caveolar constituents in MDR cells compared to their drug-sensitive counterparts [113, 114, 116, 117, 123, 162], localization of P-gp in caveolae in MDR cells [113, 115] and drug sequestration in P-gp-containing cytoplasmic vesicles in MDR cells [163, 164].

Studies have also reported that a portion of the P-gp expressed at the BBB is colocalized with caveolin-1 in caveolae [125, 165]. Other studies have demonstrated that the P-gp expressed at the BBB can also interact with caveolin-1 [115, 124]. Considering the protective role of P-gp at the BBB in preventing the accumulation of many hydrophobic molecules and potentially toxic substances in the brain, modification of caveolae or caveolin levels might affect brain homeostasis. In this regard, a dramatic decrease in caveolin-1 expression has been observed in brain tumor endothelial cells compared to normal brain endothelial cells [166]. Since caveolin-1 inhibits P-gp activity [124, 127], a reduction in caveolin-1 expression could affect drug transport across the BBB and decrease chemotherapy efficiency. In addition, studies from different groups have suggested the involvement of P-gp in lipid transport (Fig. 19.4 C). Studies on P-gp activity, either drug binding or drug transport, in cells where P-gp is localized in caveolae or low-density microdomains show that P-gp is functional in these cholesterol-enriched microdomains [124, 167]. Moreover, studies have shown that cholesterol is important for the activity of P-gp, suggesting that caveolae might provide a favorable environment for its activity [168–170]. Specifically, cholesterol could interact with the substrate binding site of P-gp, suggesting that cholesterol may be transported by MDR1 P-gp (Fig. 19.4 C) [171]. Furthermore, one study has shown that P-gp mediates the ATP-dependent relocation of cholesterol from the cytosolic leaflet to the exoplasmic leaflet of the plasma membrane, suggesting that P-gp might contribute to stabilizing caveolae [172]. It was also reported that caveolin-1 binds cholesterol and mediates its efflux within caveolae via an identified, cytosolic caveolin-1 complex comprising heat-shock protein 56, cyclophilin A and cyclophilin 40, which carries cholesterol to the plasma membrane caveolae [173]. In addition, P-gp in caveolae might contribute towards decreasing the formation of ceramide, which is involved in apoptosis induction [174]. Elevated levels of glucosylceramide, the precursor of ceramide, were observed in MDR cells and appeared to be due to the high activity of glucosylceramide synthase activity. Also,

it has been shown that sphingomyelin (SM) and the enzyme converting SM into ceramide, called sphingomyelinase, are enriched in caveolae in MDR cells [175, 176]. However, further studies are required to have a better understanding of the role of P-gp in caveolae at the BBB.

## **19.6**

### **Conclusions**

Overall, P-gp plays an important role in brain protection at the BBB. Its expression at the luminal side of endothelial cells in brain capillaries prevents the passage of many agents into the brain [9, 81, 177]. Moreover, many studies have proposed that the capillary EC of brain tumors participates in the resistance associated with P-gp expression, especially at the edge of tumors, where the BBB remains a formidable obstacle for the penetration of anticancer drugs into the brain regions infiltrated by cancer cells [98]. The development of P-gp inhibitors in order to reverse the MDR phenotype has been extensively investigated with generally disappointing results. The current, third-generation inhibitors present high potency and specificity for P-gp. Further studies are required to establish their contribution to potential therapeutic treatment by reversing P-gp-mediated MDR. It was recently reported, in MDR cells, that a portion of the P-gp present in the endothelial cells of the BBB is localized in caveolar microdomains [113, 115]. This particular localization could be useful for understanding the function and regulation of P-gp in drug elimination and transport across the BBB. Finally, recent observations have challenged the notion that P-gp has evolved merely to mediate the efflux of xenobiotics and raised the possibility that P-gp and related transporters might play a fundamental role in regulating cell differentiation, migration, proliferation and survival [174].

### **Acknowledgments**

This work was supported by a grant to R.B. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

## References 451

## References

- 1 W.M. Pardridge **1999**, *J. Neurovirol.* 5, 556.
- 2 H. Kusuhara, Y. Sugiyama **2001**, *Drug Discov. Today* 6, 206.
- 3 H. Kusuhara, Y. Sugiyama **2001**, *Drug Discov. Today* 6, 150.
- 4 A. Tsuji, I. I. Tamai **1999**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36, 277.
- 5 A. B. De Boer, E.L. De Lange, I. C. Van Der Sandt, D.D. Breimer **1998**, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 36, 14.
- 6 Y. Zhang, W.M. Pardridge **2001**, *J. Neurochem.* 76, 1597.
- 7 M.D. Habgood, D.J. Begley, N. J. Abbott **2000**, *Cell Mol. Neurobiol.* 20, 231.
- 8 J. Van Asperen, U. Mayer, O. Van Tellingen, J.H. Beijnen **1997**, *J. Pharm.Sci.* 86, 881.
- 9 A.H. Schinkel **1999**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36, 179.
- 10 R. L. Juliano, V. Ling **1976**, *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152.
- 11 C. F. Higgins, P. D. Haag, K. Nikaido, F. Ardeshtir, G. Garcia, G. F. Ames **1982**, *Nature* 298, 723.
- 12 S. C. Hyde, P. Emsley, M. J. Hartshorn, M.M. Mimmack, U. Gileadi, S. R. Pearce, M.P. Gallagher, D.R. Gill, R. E. Hubbard, C. F. Higgins **1990**, *Nature* 346, 362.
- 13 M. Dean, Y. Hamon, G. Chimini **2001**, *J. Lipid Res.* 42, 1007.
- 14 P. Borst, R.O. Elferink **2002**, *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537.
- 15 I. Klein, B. Sarkadi, A. Varadi **1999**, *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 237.
- 16 J. F. Gherzi-Egea, N. Strazielle **2002**, *J. Drug Target.* 10, 353.
- 17 C. Cordon-Cardo, J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J.L. Biedler, M.R. Melamed, J. R. Bertino **1989**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 695.
- 18 F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, M.C. Willingham **1989**, *J. Histochem. Cytochem.* 37, 159.
- 19 J. J. Smit, A.H. Schinkel, R. P. Oude Elferink, A. K. Groen, E. Wagenaar, L. Van Deemter, C.A. Mol, R. Ottenhoff, N.M. Van Der Lugt, M.A. Van Roon, et al. **1993**, *Cell* 75, 451.
- 20 A.H. Schinkel, J. J. Smit, O. Van Tellingen, J.H. Beijnen, E. Wagenaar, L. Van Deemter, C.A. Mol, M.A. Van Der Valk, E. C. Robanus-Maandag, H.P. Te Riele, et al. **1994**, *Cell* 77, 491.
- 21 A.H. Schinkel **1997**, *Semin. Cancer Biol.* 8, 161.
- 22 A.H. Schinkel **1998**, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 36, 9.
- 23 A.M. Karssen, O.C. Meijer, I.C. Van Der Sandt, P. J. Lucassen, E. C. De Lange, A. G. De Boer, E.R. De Kloet **2001**, *Endocrinology* 142, 2686.
- 24 M.M. Gottesman, C. A. Hrycyna, P.V. Schoenlein, U.A. Germann, I. Pastan **1995**, *Annu. Rev. Genet.* 29, 607.
- 25 A. Devault, P. Gros **1990**, *Mol. Cell Biol.* 10, 1652.
- 26 P. Gros, Y. B. Ben Neriah, J.M. Croop, D.E. Housman **1986**, *Nature* 323, 728.
- 27 D. Boscoboinik, M.T. Debanne, A. R. Stafford, C.Y. Jung, R. S. Gupta, R.M. Epand **1990**, *Biochim. Biophys. Acta* 1027, 225.
- 28 L. Jette, M. Potier, R. Beliveau **1997**, *Biochemistry* 36, 13929.

- 29 M.F. Rosenberg, R. Callaghan, R. C. Ford, C. F. Higgins **1997**, *J. Biol. Chem.* 272, 10685.
- 30 T.W. Loo, D.M. Clarke **1999**, *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 315.
- 31 T.W. Loo, D.M. Clarke **2001**, *J. Biol. Chem.* 276, 14972.
- 32 T.W. Loo, D.M. Clarke **2002**, *J. Biol. Chem.* 277, 44332.
- 33 S. Dey, P. Hafkemeyer, I. Pastan, M.M. Gottesman **1999**, *Biochemistry* 38, 6630.
- 34 M. Demeule, A. Laplante, A. Sepehr-Arae, E. Beaulieu, D. Averill-Bates, R.M. Wenger, R. Beliveau **1999**, *Biochem. Cell Biol.* 77, 47.
- 35 A. B. Shapiro, A. B. Corder, V. Ling **1997**, *Eur. J. Biochem.* 250, 115.
- 36 F. Tang, H. Ouyang, J. Z. Yang, R.T. Borchardt **2004**, *J. Pharm. Sci.* 93, 1185.
- 37 M.F. Rosenberg, A. B. Kamis, R. Callaghan, C. F. Higgins, R. C. Ford **2003**, *J. Biol. Chem.* 278, 8294.
- 38 I. K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese **2004**, *J. Med. Chem.* 47, 2523.
- 39 M.M. Gottesman, I. Pastan, S.V. Ambudkar **1996**, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 610.
- 40 S.V. Ambudkar, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M.M. Gottesman **1999**, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 361.
- 41 J. A. Silverman **1999**, *Pharm. Biotechnol.* 12, 353.
- 42 S. J. Thompson, K. Koszdin, C.M. Bernards **2000**, *Anesthesiology* 92, 1392.
- 43 M.F. Fromm **2004**, *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 423.
- 44 M. Uhr, F. Holsboer, M.B. Muller **2002**, *J. Neuroendocrinol.* 14, 753.
- 45 H. Kawaguchi, Y. Matsui, Y. Watanabe, Y. Takakura **2004**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 91.
- 46 Y. Akazawa, H. Kawaguchi, M. Funahashi, Y. Watanabe, K. Yamaoka, M. Hashida, Y. Takakura **2002**, *J. Pharm. Sci.* 91, 2110.
- 47 L. Bonhomme-Faivre, A. Pelloquin, S. Tardivel, S. Urien, M.C. Mathieu, V. Castagne, B. Lacour, R. Farinotti **2002**, *Anticancer Drugs* 13, 51.
- 48 R. P. Oude Elferink, J. Zadina **2001**, *Peptides* 22, 2015.
- 49 N. Uchiyama-Kokubu, M. Naito, M. Nakajima, T. Tsuruo **2004**, *FEBS Lett.* 574, 55.
- 50 T. R. Stouch, O. Gudmundsson **2002**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 315.
- 51 S. Ekins, C. L. Waller, P.W. Swaan, G. Cruciani, S. A. Wrighton, J.H. Wikel **2000**, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 251.
- 52 K.M. Mahar Doan, J. E. Humphreys, L.O. Webster, S.A. Wring, L. J. Shampine, C. J. Serabjit-Singh, K. K. Adkison, J.W. Polli **2002**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 1029.
- 53 R. Didziapetris, P. Japertas, A. Avdeef, A. Petrauskas **2003**, *J. Drug Target.* 11, 391.
- 54 J.M. Ford, W. N. Hait **1990**, *Pharmacol. Rev.* 42, 155.
- 55 B. L. Lum, M.P. Gosland, S. Kaubisch, B. I. Sikic **1993**, *Pharmacotherapy* 13, 88.
- 56 M. Raderer, W. Scheithauer **1993**, *Cancer* 72, 3553.
- 57 P. R. Twentyman **1992**, *Biochem. Pharmacol.* 43, 109.
- 58 H. Thomas, H.M. Coley **2003**, *Cancer Control* 10, 159.

## References 453

- 59 C. Wandel, R. B. Kim, S. Kajiji, P. Guengerich, G. R. Wilkinson, A. J. Wood **1999**, *Cancer Res.* 59, 3944.
- 60 E. K. Rowinsky, L. Smith, Y.M. Wang, P. Chaturvedi, M. Villalona, E. Campbell, C. Aylesworth, S. G. Eckhardt, L. Hammond, M. Kraynak, R. Drengler, J. Stephenson, Jr., M.W. Harding, D.D. Von Hoff **1998**, *J. Clin. Oncol.* 16, 2964.
- 61 D. Xu, H. Kang, M. Fisher, R.L. Juliano **2004**, *Mol. Pharmacol.* 66, 268.
- 62 Z. Peng, Z. Xiao, Y. Wang, P. Liu, Y. Cai, S. Lu, W. Feng, Z. C. Han **2004**, *Cancer Gene Ther.* 11, 707.
- 63 N. Romiti, R. Tongiani, F. Cervelli, E. Chieli **1998**, *Life Sci.* 62, 2349.
- 64 S. Zhou, L.Y. Lim, B. Chowbay **2004**, *Drug Metab. Rev.* 36, 57.
- 65 K. A. Youdim, M.Z. Qaiser, D. J. Begley, C.A. Rice-Evans, N. J. Abbott **2004**, *Free Radic. Biol. Med.* 36, 592.
- 66 J. Jodoin, M. Demeule, R. Beliveau **2002**, *Biochim. Biophys. Acta* 1542, 149.
- 67 A.T. Fojo, K. Ueda, D.J. Slamon, D.G. Poplack, M.M. Gottesman, I. Pastan **1987**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 265.
- 68 F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, M.C. Willingham **1987**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84, 7735.
- 69 C. Cordon-Cardo, J. P. O'Brien, J. Boccia, D. Casals, J. R. Bertino, M.R. Melamed **1990**, *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1277.
- 70 L. Jette, B. Tetu, R. Beliveau **1993**, *Biochim. Biophys. Acta* 1150, 147.
- 71 M.A. Barrand, K. J. Robertson, S. F. Von Weikersthal **1995**, *FEBS Lett.* 374, 179.
- 72 A. Tsuji, T. Terasaki, Y. Takabatake, Y. Tenda, I. Tamai, T. Yamashima, S. Moritani, T. Tsuruo, J. Yamashita **1992**, *Life Sci.* 51, 1427.
- 73 X. Decleves, A. Regina, J. L. Laplanche, F. Roux, B. Boval, J.M. Launay, J.M. Scherrmann **2000**, *J. Neurosci. Res.* 60, 594.
- 74 P.T. Ronaldson, M. Bendayan, D. Gingras, M. Piquette-Miller, R. Bendayan **2004**, *J. Neurochem.* 89, 788.
- 75 G. Lee, L. Schlichter, M. Bendayan, R. Bendayan **2001**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 204.
- 76 C. Mercier, C. Masseguin, F. Roux, J. Gabrion, J. M. Scherrmann **2004**, *Brain Res.* 1021, 32.
- 77 W.M. Pardridge, P. L. Golden, Y. S. Kang, U. Bickel **1997**, *J. Neurochem.* 68, 1278.
- 78 P. L. Golden, W.M. Pardridge **1999**, *Brain Res.* 819, 143.
- 79 F. Schlachetzki, W.M. Pardridge **2003**, *Neuroreport* 14, 2041.
- 80 M. Demeule, M. Labelle, A. Regina, F. Berthelet, R. Beliveau **2001**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 827.
- 81 E. Beaulieu, M. Demeule, L. Ghitescu, R. Beliveau **1997**, *Biochem. J.* 326, 539.
- 82 A.H. Schinkel, E. Wagenaar, L. Van Deemter, C.A. Mol, P. Borst **1995**, *J. Clin. Invest.* 96, 1698.
- 83 V.V. Rao, J. L. Dahlheimer, M.E. Bardgett, A. Z. Snyder, R.A. Finch, A. C. Sartorelli, D. Piwnica-Worms **1999**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 3900.

- 84 K. E. Warren, M.C. Patel, C.M. Mccully, L.M. Montuenga, F.M. Balis **2000**, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45, 207.
- 85 R. B. Kim **2003**, *Top. HIV Med.* 11, 136.
- 86 W. Loscher, H. Potschka **2002**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 7.
- 87 F. C. Lam, R. Liu, P. Lu, A.B. Shapiro, J. M. Renoir, F. J. Sharom, P. B. Reiner **2001**, *J. Neurochem.* 76, 1121.
- 88 T. Furuno, M.T. Landi, M. Ceroni, N. Caporaso, I. Bernucci, G. Nappi, E. Martignoni, E. Schaeffeler, M. Eichelbaum, M. Schwab, U.M. Zanger **2002**, *Pharmacogenetics* 12, 529.
- 89 M. Demeule, A. Laplante, G. F. Murphy, R.M. Wenger, R. Beliveau **1998**, *Biochemistry* 37, 18110.
- 90 I. Sugawara, H. Hamada, T. Tsuruo, S. Mori **1990**, *Jpn J. Cancer Res.* 81, 727.
- 91 K. Toth, M.M. Vaughan, N. S. Peress, H.K. Slocum, Y.M. Rustum **1996**, *Am. J. Pathol.* 149, 853.
- 92 T. Sawada, Y. Kato, N. Sakayori, Y. Takekawa, M. Kobayashi **1999**, *Brain Tumor Pathol.* 16, 23.
- 93 M. Demeule, D. Shedid, E. Beaulieu, R. F. Del Maestro, A. Moghrabi, P. B. Ghosn, R. Moumdjian, F. Berthelet, R. Beliveau **2001**, *Int. J. Cancer* 93, 62.
- 94 I. Becker, K.F. Becker, R. Meyermann, V. Holtt **1991**, *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 516.
- 95 J.W. Henson, C. Cordon-Cardo, J. B. Posner **1992**, *J. Neurooncol.* 14, 37.
- 96 F. Leweke, M.S. Damian, C. Schindler, W. Schachenmayr **1998**, *Pathol. Res. Pract.* 194, 149.
- 97 T. Sawada, Y. Kato, M. Kobayashi, Y. Takekawa **2000**, *Brain Tumor Pathol.* 17, 1.
- 98 M. Bertossi, D. Virgintino, E. Maiorano, M. Occhiogrosso, L. Roncali **1997**, *Ultrastruct. Pathol.* 21, 41.
- 99 L. Gaspar, C. Scott, M. Rotman, S. Asbell, T. Phillips, T. Wasserman, W. G. Mckenna, R. Byhardt **1997**, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 37, 745.
- 100 A. Tosoni, M. Ermani, A. A. Brandes **2004**, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 52, 199.
- 101 B. Savas, G. Arslan, T. Gelen, G. Karpuzoglu, C. Ozkaynak **1999**, *Anticancer Res.* 19, 4413.
- 102 P. Borst, R. Evers, M. Kool, J. Wijnholds **2000**, *J. Natl Cancer Inst.* 92, 1295.
- 103 M.J. Flens, G. J. Zaman, P. Van Der Valk, M.A. Izquierdo, A. B. Schroeijs, G. L. Scheffer, P. Van Der Groep, M. De Haas, C. J. Meijer, R. J. Scheper **1996**, *Am. J. Pathol.* 148, 1237.
- 104 S. P. Cole, G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E.U. Kurz, A.M. Duncan, R. G. Deeley **1992**, *Science* 258, 1650.
- 105 A. Regina, A. Koman, M. Piciotti, B. El Hafny, M.S. Center, R. Bergmann, P. O. Couraud, F. Roux **1998**, *J. Neurochem.* 71, 705.
- 106 H. Huai-Yun, D.T. Secrest, K. S. Mark, D. Carney, C. Brandquist, W. F. Elmquist, D.W. Miller **1998**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 816.

## References 455

- 107 H. Kusuhara, H. Suzuki, M. Naito, T. Tsuruo, Y. Sugiyama **1998**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 1260.
- 108 S. Seetharaman, M.A. Barrand, L. Maskell, R. J. Scheper **1998**, *J. Neurochem.* 70, 1151.
- 109 M. Demeule, M. Brossard, R. Beliveau **1999**, *Am. J. Physiol.* 277, F832.
- 110 Y. Zhang, H. Han, W. F. Elmquist, D.W. Miller **2000**, *Brain Res.* 876, 148.
- 111 T. Abe, S. Hasegawa, K. Taniguchi, A. Yokomizo, T. Kuwano, M. Ono, T. Mori, S. Hori, K. Kohno, M. Kuwano **1994**, *Int. J. Cancer* 58, 860.
- 112 S. Haga, E. Hinoshita, K. Ikezaki, M. Fukui, G. L. Scheffer, T. Uchiumi, M. Kuwano **2001**, *Jpn J. Cancer Res.* 92, 211.
- 113 Y. Lavie, G. Fiucci, M. Liscovitch **1998**, *J. Biol. Chem.* 273, 32380.
- 114 C. P. Yang, F. Galbiati, D. Volonte, S. B. Horwitz, M.P. Lisanti **1998**, *FEBS Lett.* 439, 368.
- 115 M. Demeule, J. Jodoin, D. Gingras, R. Beliveau **2000**, *FEBS Lett.* 466, 219.
- 116 Y. Lavie, G. Fiucci, M. Czarny, M. Liscovitch **1999**, *Lipids* 34[Suppl.], S57.
- 117 Y. Lavie, M. Liscovitch **2000**, *Glycoconj. J.* 17, 253.
- 118 P.W. Shaul, R. G. Anderson **1998**, *Am. J. Physiol.* 275, L843.
- 119 P. E. Scherer, R.Y. Lewis, D. Volonte, J. A. Engelman, F. Galbiati, J. Couet, D.S. Kohtz, E. Van Donselaar, P. Peters, M.P. Lisanti **1997**, *J. Biol. Chem.* 272, 29337.
- 120 Z. Tang, P. E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D.S. Kohtz, I. Nishimoto, H.F. Lodish, M.P. Lisanti **1996**, *J. Biol. Chem.* 271, 2255.
- 121 T. Ikezu, H. Ueda, B. D. Trapp, K. Nishiyama, J. F. Sha, D. Volonte, F. Galbiati, A. L. Byrd, G. Bassell, H. Serizawa, W. S. Lane, M.P. Lisanti, T. Okamoto **1998**, *Brain Res.* 804, 177.
- 122 Y. Lavie, H. Cao, S. L. Bursten, A. E. Giuliano, M.C. Cabot **1996**, *J. Biol. Chem.* 271, 19530.
- 123 Y. Lavie, G. Fiucci, M. Liscovitch **2001**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49, 317.
- 124 J. Jodoin, M. Demeule, L. Fenart, R. Cecchelli, S. Farmer, K. J. Linton, C. F. Higgins, R. Beliveau **2003**, *J. Neurochem.* 87, 1010.
- 125 R. Bendayan, G. Lee, M. Bendayan **2002**, *Microsc. Res. Tech.* 57, 365.
- 126 D. Virgintino, M. Errede, D. Robertson, C. Capobianco, F. Girolamo, A. Vimercati, M. Bertossi, L. Roncali **2004**, *Histochem. Cell Biol.* 122, 51.
- 127 C. Cai, J. Chen **2004**, *Int. J. Cancer* 111, 522.
- 128 M.S. Poruchynsky, V. Ling **1994**, *Biochemistry* 33, 4163.
- 129 J. C. Taylor, A.R. Horvath, C. F. Higgins, G. S. Begley **2001**, *J. Biol. Chem.* 276, 36075.
- 130 J. Bertram, K. Palfner, W. Hiddemann, M. Kneba **1996**, *Anticancer Drugs* 7, 838.
- 131 T.W. Loo, D.M. Clarke **1995**, *J. Biol. Chem.* 270, 21839.
- 132 F. Luciani, A. Molinari, F. Lozupone, A. Calcabrini, L. Lugini, A. Stringaro, P. Puddu, G. Arancia, M. Cianfriglia, S. Fais **2002**, *Blood* 99, 641.
- 133 J. Couet, M. Sargiacomo, M.P. Lisanti **1997**, *J. Biol. Chem.* 272, 30429.
- 134 T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, M.P. Lisanti **1998**, *J. Biol. Chem.* 273, 5419.

- 135 L. Labrecque, I. Royal, D.S. Surprenant, C. Patterson, D. Gingras, R. Beliveau **2003**, *Mol. Biol. Cell* 14, 334.
- 136 C. Marzolini, E. Paus, T. Buclin, R. B. Kim **2004**, *Clin. Pharmacol. Ther.* 75, 13.
- 137 C. Pauli-Magnus, D. L. Kroetz **2004**, *Pharm. Res.* 21, 904.
- 138 M.F. Fromm **2002**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1295.
- 139 J.H. Lin, M. Yamazaki **2003**, *Clin. Pharmacokinet.* 42, 59.
- 140 M. Schwab, E. Schaeffeler, C. Marx, M. F. Fromm, B. Kaskas, J. Metzler, E. Stange, H. Herfarth, J. Schoelmerich, M. Gregor, S. Walker, I. Cascorbi, I. Roots, U. Brinkmann, U.M. Zanger, M. Eichelbaum **2003**, *Gastroenterology* 124, 26.
- 141 E. Schaeffeler, M. Eichelbaum, U. Brinkmann, A. Penger, S. Asante-Poku, U.M. Zanger, M. Schwab **2001**, *Lancet* 358, 383.
- 142 J.G. Elmore, V. M. Mocerri, D. Carter, E.B. Larson **1998**, *Cancer* 83, 2509.
- 143 N. Kioka, J. Tsubota, Y. Kakehi, T. Komano, M.M. Gottesman, I. Pastan, K. Ueda **1989**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 224.
- 144 G. Chen, G. E. Duran, K. A. Steger, N. J. Lacayo, J. P. Jaffrezou, C. Dumontet, B. I. Sikic **1997**, *J. Biol. Chem.* 272, 5974.
- 145 T. Hoof, A. Demmer, M.R. Hadam, J. R. Riordan, B. Tummler **1994**, *J. Biol. Chem.* 269, 20575.
- 146 I. Sugawara, I. Kataoka, Y. Morishita, H. Hamada, T. Tsuruo, S. Itoyama, S. Mori **1988**, *Cancer Res.* 48, 1926.
- 147 T. Ito, I. Yano, K. Tanaka, K. I. Inui **1997**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 955.
- 148 E. G. Schuetz, A.H. Schinkel, M.V. Relling, J. D. Schuetz **1996**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 4001.
- 149 M. Drozdzik, M. Bialecka, K. Mysliwiec, K. Honczarenko, J. Stankiewicz, Z. Sych **2003**, *Pharmacogenetics* 13, 259.
- 150 T. Litman, T. E. Druley, W.D. Stein, S. E. Bates **2001**, *Cell Mol. Life Sci.* 58, 931.
- 151 A. Yamauchi, I. Ieiri, Y. Kataoka, M. Tanabe, T. Nishizaki, R. Oishi, S. Higuchi, K. Otsubo, K. Sugimachi **2002**, *Transplantation* 74, 571.
- 152 A. Siddiqui, R. Kerb, M.E. Weale, U. Brinkmann, A. Smith, D.B. Goldstein, N.W. Wood, S.M. Sisodiya **2003**, *N. Engl. J. Med.* 348, 1442.
- 153 J. Sun, Z.G. He, G. Cheng, S. J. Wang, X.H. Hao, M.J. Zou **2004**, *Med. Sci. Monit.* 10, Ra5.
- 154 S.V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna, M.M. Gottesman **2003**, *Oncogene* 22, 7468.
- 155 B. Greiner, M. Eichelbaum, P. Fritz, H. P. Kreichgauer, O. Von Richter, J. Zundler, H.K. Kroemer **1999**, *J. Clin. Invest.* 104, 147.
- 156 L. Becquemont, C. Verstuyft, R. Kerb, U. Brinkmann, M. Lebot, P. Jaillon, C. Funck-Brentano **2001**, *Clin. Pharmacol. Ther.* 70, 311.
- 157 D. Durr, B. Stieger, G.A. Kullak-Ublick, K.M. Rentsch, H.C. Steinert, P. J. Meier, K. Fattinger **2000**, *Clin. Pharmacol. Ther.* 68, 598.
- 158 L. Jette, G. F. Murphy, J.M. Leclerc, R. Beliveau **1995**, *Biochem. Pharmacol.* 50, 1701.



## References 457

- 159 S. Cisternino, C. Rousselle, C. Dagenais, J.M. Scherrmann **2001**, *Pharm.Res.* 18, 183.
- 160 C. K. Van Kalken, H.J. Broxterman, H.M. Pinedo, N. Feller, H. Dekker, J. Lankelma, G. Giaccone **1993**, *Br. J. Cancer* 67, 284.
- 161 M. King, W. Su, A. Chang, A. Zuckerman, G.W. Pasternak **2001**, *Nat. Neurosci.* 4, 268.
- 162 M. Liscovitch, Y. Lavie **2000**, *Trends Biochem. Sci.* 25, 530.
- 163 M.R. Abbaszadegan, A. E. Cress, B.W. Futscher, W.T. Bellamy, W.S. Dalton **1996**, *Cancer Res.* 56, 5435.
- 164 A. B. Shapiro, K. Fox, P. Lee, Y. D. Yang, V. Ling **1998**, *Int. J. Cancer* 76, 857.
- 165 D. Virgintino, D. Robertson, M. Errede, V. Benagiano, F. Girolamo, E. Maiorano, L. Roncali, M. Bertossi **2002**, *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1671.
- 166 A. Regina, J. Jodoin, P. Khoeir, Y. Rolland, F. Berthelet, R. Moumdjian, L. Fenart, R. Cecchelli, M. Demeule, R. Beliveau **2004**, *J. Neurosci. Res.* 75, 291.
- 167 G. D. Luker, C.M. Pica, A. S. Kumar, D.F. Covey, D. Piwnica-Worms **2000**, *Biochemistry* 39, 8692.
- 168 A. Rothnie, D. Theron, L. Soceneantu, C. Martin, M. Traikia, G. Berridge, C. F. Higgins, P. F. Devaux, R. Callaghan **2001**, *Eur. Biophys. J.* 30, 430.
- 169 S. Modok, C. Heyward, R. Callaghan **2004**, *J. Lipid Res.* 45, 1910.
- 170 J. Troost, H. Lindenmaier, W.E. Haefeli, J. Weiss **2004**, *Mol. Pharmacol.* 66, 1332.
- 171 E. Wang, C.N. Casciano, R. P. Clement, W.W. Johnson **2000**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 909.
- 172 A. Garrigues, A. E. Escargueil, S. Orłowski **2002**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 10347.
- 173 A. Uittenbogaard, Y. Ying, E. J. Smart **1998**, *J. Biol. Chem.* 273, 6525.
- 174 R.W. Johnstone, A. A. Ruefli, M.J. Smyth **2000**, *Trends Biochem. Sci.* 25, 1.
- 175 R. J. Veldman, N. Maestre, O.M. Aduib, J. A. Medin, R. Salvayre, T. Levade **2001**, *Biochem. J.* 355, 859.
- 176 E. Romiti, E. Meacci, G. Tanzi, L. Becciolini, S. Mitsutake, M. Farnararo, M. Ito, P. Bruni **2001**, *FEBS Lett* 506, 163.
- 177 A. Regina, M. Demeule, A. Laplante, J. Jodoin, C. Dagenais, F. Berthelet, A. Moghrabi, R. Beliveau **2001**, *Cancer Metastasis Rev.* 20, 13.
- 178 J. W. Polli, S. A. Wring, J. E. Humphreys, L. Huang, J. B. Morgan, L. O. Webster, C.S. Serabjit-Singh **2001**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 620.
- 179 M.M. Cornwell, I. Pastan, M.M. Gottesman **1987**, *J. Biol. Chem.* 262, 2166.
- 180 G.H. Mickisch, G.T. Merlino, P.M. Aiken, M.M. Gottesman, I. Pastan **1991**, *J. Urol.* 146, 447.
- 181 L. Gianni **1997**, *Semin. Oncol.* 24, S10.
- 182 C. Wandel, R. B. Kim, F. P. Guengerich, A. J. Wood **2000**, *Drug Metab. Dispos.* 28, 895.
- 183 N. Drion, P. Risede, N. Cholet, C. Chanez, J.M. Scherrmann **1997**, *J. Neurosci. Res.* 49, 80.

- 184 W. S. Dalton, T.M. Grogan, P. S. Meltzer, R. J. Scheper, B.G. Durie, C.W. Taylor, T.P. Miller, S.E. Salmon **1989**, *J. Clin. Oncol.* 7, 415.
- 185 T. P. Miller, T.M. Grogan, W. S. Dalton, C.M. Spier, R. J. Scheper, S.E. Salmon **1991**, *J. Clin. Oncol.* 9, 17.
- 186 M.S. Cairo, S. Siegel, N. Anas, L. Sender **1989**, *Cancer Res.* 49, 1063.
- 187 M.J. Millward, B.M. Cantwell, N. C. Munro, A. Robinson, P. A. Corris, A. L. Harris **1993**, *Br. J. Cancer* 67, 1031.
- 188 A. Regina, I. A. Romero, J. Greenwood, P. Adamson, J.M. Bourre, P. O. Couraud, F. Roux **1999**, *J. Neurochem.* 73, 1954.
- 189 O.C. Meijer, E.C. De Lange, D.D. Breimer, A.G. De Boer, J.O. Workel, E. R. De Kloet **1998**, *Endocrinology* 139, 1789.
- 190 P. Wils, V. Phung-Ba, A. Warnery, D. Lechardeur, S. Raeissi, I. J. Hidalgo, D. Scherman **1994**, *Biochem. Pharmacol.* 48, 1528.
- 191 D. Kessel, W.T. Beck, D. Kukuruga, V. Schulz **1991**, *Cancer Res.* 51, 4665.
- 192 T. Ohnishi, I. Tamai, K. Sakanaka, A. Sakata, T. Yamashima, J. Yamashita, A. Tsuji **1995**, *Biochem. Pharmacol.* 49, 1541.
- 193 C. S. Hughes, S. L. Vaden, C. A. Manaugh, G. S. Price, L. C. Hudson **1998**, *J. Neurooncol.* 37, 45.
- 194 D.E. Burgio, M.P. Gosland, P. J. Mcnamara **1998**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 911.
- 195 A. Eneroth, E. Astrom, J. Hoogstraate, D. Schrenk, S. Conrad, H.M. Kauffmann, K. Gjellan **2001**, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 205.
- 196 M. Essodaigui, H.J. Broxterman, A. Garnier-Suillerot **1998**, *Biochemistry* 37, 2243.
- 197 M. Kavallaris, J. Madafiglio, M.D. Norris, M. Haber **1993**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 79.
- 198 P. Gros, F. Talbot, D. Tang-Wai, E. Bibi, H.R. Kaback **1992**, *Biochemistry* 31, 1992.
- 199 J. A. Kellen, E. George, V. Ling **1991**, *Anticancer Res.* 11, 1243.
- 200 M.J. Millward, B.M. Cantwell, E. A. Lien, J. Carmichael, A. L. Harris **1992**, *Eur. J. Cancer* 28a, 805.
- 201 D.L. Trump, D.C. Smith, P. G. Ellis, M.P. Rogers, S. C. Schold, E. P. Winer, T. J. Panella, V. C. Jordan, R. L. Fine **1992**, *J. Natl Cancer Inst.* 84, 1811.
- 202 C. Yamamoto, H. Murakami, N. Koyabu, H. Takanaga, H. Matsuo, T. Uchiumi, M. Kuwano, M. Naito, T. Tsuruo, H. Ohtani, Y. Sawada **2002**, *J. Pharm. Pharmacol.* 54, 1055.
- 203 J. Van Asperen, A.H. Schinkel, J.H. Beijnen, W. J. Nooijen, P. Borst, O. Van Tellingen **1996**, *J. Natl Cancer Inst.* 88, 994.
- 204 A. Tsuji, I. Tamai, A. Sakata, Y. Tenda, T. Terasaki **1993**, *Biochem. Pharmacol.* 46, 1096.
- 205 A.H. Schinkel, E. Wagenaar, C.A. Mol, L. Van Deemter **1996**, *J. Clin. Invest.* 97, 2517.
- 206 J.W. Polli, J. L. Jarrett, S.D. Studenberg, J. E. Humphreys, S.W. Dennis, K. R. Brouwer, J.L. Woolley **1999**, *Pharm. Res.* 16, 1206.
- 207 D.S. Miller, G. Fricker, J. Drewe **1997**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 440.

## References 459

- 208 R. J. Arceci, K. Stieglitz, B. E. Bierer **1992**, *Blood* 80, 1528.
- 209 A. E. Kim, J.M. Dintaman, D.S. Waddell, J. A. Silverman **1998**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 1439.
- 210 C.G. Lee, M.M. Gottesman, C.O. Cardarelli, M. Ramachandra, K.T. Jeang, S.V. Ambudkar, I. Pastan, S. Dey **1998**, *Biochemistry* 37, 3594.
- 211 V. J. Wachter, J.A. Silverman, S. Wong, P. Tran-Tau, A. O. Chan, A. Chai, X.Q. Yu, D. O'mahony, Z. Ramtools **2002**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 308.
- 212 T. Saeki, K. Ueda, Y. Tanigawara, R. Hori, T. Komano **1993**, *J. Biol. Chem.* 268, 6077.
- 213 I. C. Van Der Sandt, C.M. Vos, L. Nabulsi, M.C. Blom-Rosemalen, H.H. Voorwinden, A. G. De Boer, D.D. Breimer **2001**, *Aids* 15, 483.
- 214 A.H. Schinkel, C. A. Mol, E. Wagenaar, L. Van Deemter, J. J. Smit, P. Borst **1995**, *Eur. J. Cancer* 31a, 1295.
- 215 U. Mayer, E. Wagenaar, B. Dorobek, J. H. Beijnen, P. Borst, A.H. Schinkel **1997**, *J. Clin. Invest.* 100, 2430.
- 216 H. Kusuhara, H. Suzuki, T. Terasaki, A. Kakee, M. Lemaire, Y. Sugiyama **1997**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 574.
- 217 C. Pauli-Magnus, T. Murdter, A. Godel, T. Mettang, M. Eichelbaum, U. Klotz, M.F. Fromm **2001**, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363, 337.
- 218 G. Fricker, S. Nobmann, D.S. Miller **2002**, *Br. J. Pharmacol.* 135, 1308.
- 219 R. Xie, M. Hammarlund-Udenaes, A. G. De Boer, E.C. De Lange **1999**, *Br. J. Pharmacol.* 128, 563.
- 220 C. Dagenais, J. Ducharme, G.M. Pollack **2001**, *Neurosci. Lett.* 301, 155.
- 221 F. J. Sharom, X. Yu, P. Lu, R. Liu, J.W. Chu, K. Szabo, M. Muller, C.D. Hose, A. Monks, A. Varadi, J. Seprodi, B. Sarkadi **1999**, *Biochem. Pharmacol.* 58, 571.
- 222 M. Takano, R. Hasegawa, T. Fukuda, R. Yumoto, J. Nagai, T. Murakami **1998**, *Eur. J. Pharmacol.* 358, 289.
- 223 E. G. Schuetz, K. Yasuda, K. Arimori, J. D. Schuetz **1998**, *Arch. Biochem. Biophys.* 350, 340.
- 224 D.W. Loe, F. J. Sharom **1994**, *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 72.
- 225 H. Tohda, A. Yasui, T. Yasumoto, M. Nakayasu, H. Shima, M. Nagao, T. Sugimura **1994**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1210.
- 226 J. Dimitroulakos, H. Yeger **1996**, *Nat. Med.* 2, 326.
- 227 S. Orlowski, L.M. Mir, J. Belehradec Jr., M. Garrigos **1996**, *Biochem. J.* 317, 515.
- 228 K. Ueda, N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, T. Saeki, N. Kioka, T. Komano, R. Hori **1992**, *J. Biol. Chem.* 267, 24248.
- 229 D.C. Wolf, S. B. Horwitz **1992**, *Int. J. Cancer* 52, 141.
- 230 A.M. Karssen, O.C. Meijer, I.C. Van Der Sandt, A. G. De Boer, E.C. De Lange, E. R. De Kloet **2002**, *J. Endocrinol.* 175, 251.
- 231 A. Van Helvoort, M.L. Giudici, M. Thielemans, G. Van Meer **1997**, *J. Cell Sci.* 110, 75.
- 232 P. A. Philip, S. Joel, S. C. Monkman, E. Dolega-Ossowski, K. Tonkin, J. Carmichael, J. R. Idle, A. L. Harris **1992**, *Br. J. Cancer* 65, 267.

- 233 R. D. Christen, E. F. McClay, S.C. Plaxe, S. S. Yen, S. Kim, S. Kirmani, L. L. Wilgus, D.D. Heath, D.R. Shalinsky, J.L. Freddo, et al. **1993**, *J. Clin. Oncol.* 11, 2417.
- 234 E. Solary, B. Witz, D. Caillot, P. Moreau, B. Desablens, J.Y. Cahn, A. Sadoun, B. Pignon, C. Berthou, F. Maloisel, D. Guyotat, P. Casassus, N. Ifrah, Y. Lamy, B. Audhuy, P. Colombat, J. L. Harousseau **1996**, *Blood* 88, 1198.
- 235 T. P. Miller, E.M. Chase, R. Dorr, W.S. Dalton, K. S. Lam, S. E. Salmon **1998**, *Anticancer Drugs* 9, 135.
- 236 M. Lemaire, A. Bruelisauer, P. Guntz, H. Sato **1996**, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38, 481.
- 237 D. Ukena, C. Boewer, B. Oldenkott, F. Rathgeb, W. Wurst, K. Zech, G.W. Sybrecht **1995**, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36, 160.
- 238 W.H. Wilson, S. E. Bates, A. Fojo, G. Bryant, Z. Zhan, J. Regis, R. E. Wittes, E. S. Jaffe, S.M. Steinberg, J. Herdt, et al. **1995**, *J. Clin. Oncol.* 13, 1995.
- 239 R. J. Motzer, M. Mazumdar, S.C. Gulati, D.F. Bajorin, P. Lyn, V. Vlamis, G. J. Bosl **1993**, *J. Natl Cancer Inst.* 85, 1828.
- 240 A. Stewart, J. Steiner, G. Mellows, B. Laguda, D. Norris, P. Bevan **2000**, *Clin. Cancer Res.* 6, 4186.
- 241 A.H. Dantzig, R. L. Shepard, K. L. Law, L. Tabas, S. Pratt, J. S. Gillespie, S.N. Binkley, M.T. Kuhfeld, J. J. Starling, S. A. Wrighton **1999**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 854.
- 242 J. J. Starling, R. L. Shepard, J. Cao, K. L. Law, B.H. Norman, J. S. Kroin, W. J. Ehlhardt, T.M. Baughman, M.A. Winter, M.G. Bell, C. Shih, J. Gruber, W. F. Elmquist, A.H. Dantzig **1997**, *Adv. Enzyme Regul.* 37, 335.
- 243 M.J. Newman, J. C. Rodarte, K. D. Benbatoul, S. J. Romano, C. Zhang, S. Krane, E. J. Moran, R.T. Uyeda, R. Dixon, E. S. Guns, L.D. Mayer **2000**, *Cancer Res.* 60, 2964.
- 244 M. Roe, A. Folkes, P. Ashworth, J. Brumwell, L. Chima, S. Hunjan, I. Pretswell, W. Dangerfield, H. Ryder, P. Charlton **1999**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 595.
- 245 R. A. Peck, J. Hewett, M.W. Harding, Y.M. Wang, P. R. Chaturvedi, A. Bhatnagar, H. Ziessman, F. Atkins, M.J. Hawkins **2001**, *J. Clin. Oncol.* 19, 3130.
- 246 A. Sparreboom, A. S. Planting, R. C. Jewell, M.E. Van Der Burg, A. Van Der Gaast, P. De Bruijn, W. J. Loos, K. Nooter, L.H. Chandler, E.M. Paul, P. S. Wissel, J. Verweij **1999**, *Anticancer Drugs* 10, 719.
- 247 J. Molnar, D. Szabo, R. Pusztai, I. Mucsi, L. Berek, I. Ocsosvski, E. Kawata, Y. Shoyama **2000**, *Anticancer Res.* 20, 861.
- 248 S.W. Kim, H.Y. Kwon, D.W. Chi, J.H. Shim, J. D. Park, Y. H. Lee, S. Pyo, D.K. Rhee **2003**, *Biochem. Pharmacol.* 65, 75.
- 249 R. K. Bhardwaj, H. Glaeser, L. Becquemont, U. Klotz, S. K. Gupta, M.F. Fromm **2002**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 645.
- 250 C. L. Cummins, W. Jacobsen, L. Z. Benet **2002**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 1036.
- 251 E. J. Wang, M. Barecki-Roach, W.W. Johnson **2002**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 412.

*References 461*

- 252 S. Zhang, M.E. Morris **2003**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1258.
- 253 B. C. Foster, M.S. Foster, S. Vandenhoeek, A. Krantis, J.W. Budzinski, J.T. Arnason, K. D. Gallicano, S. Choudri **2001**, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 176.
- 254 M. Demeule, M. Brossard, S. Turcotte, A. Regina, J. Jodoin, R. Beliveau **2004**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 937.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbaszadegan, M.R., Cress, A.E., Futscher, B.W., Bellamy, W.T., et Dalton, W.S. 1996. «Evidence for cytoplasmic P-glycoprotein location associated with increased multidrug resistance and resistance to chemosensitizers». *Cancer Research*, vol. 56, p. 5435-5442.
- Abu-Quar, A. W., Elmasry, E., et Abou-Donia, M. B. 2003. «A role for P-glycoprotein in environmental toxicology». *Journal of Toxicology and Environmental Health*, part B, critical reviews, vol. 6, no. 3, p. 279-288.
- Akazawa, Y., Kawaguchi, H., Funahashi, M., Watanabe, Y., Yamaoka, K., Hashida, M., et Takakura, Y. 2002. "Effect of interferons on P-glycoprotein-mediated rhodamine-123 efflux in cultured rat hepatocytes". *Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 91, p. 2110-5.
- Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., et Gottesman, M. M. 1999. "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter". *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 39, p. 361-398.
- Anderson, R.G.W. 1998. «The caveolae membrane system». *Annual review of biochemistry*, vol. 67, p. 199-225.
- Anderson, H. A., Chen, Y., et Norkin, L. C. 1996. «Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae». *Molecular biology of the cell*, vol. 7, no. 11, p. 1825-1834.
- Barthomeuf, C., Grassi, J., Demeule, M., Fournier, C., Boivin, D., et Béliveau, R. 2005. «Inhibition of P-glycoprotein transport function and reversion of MDR1 multidrug resistance by cniadin». *Cancer chemotherapy and pharmacology*, vol. 56, no. 2, p. 173-181.
- Beaulieu, É., Demeule, M., Ghitescu, L., et Béliveau, R. 1997. «P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain». *The Biochemical journal*, vol. 326, p. 539-544.
- Beck, W. T. 1990. "Multidrug resistance and its circumvention". *European journal of cancer: Oxford, England*, vol. 26, no. 4, p.513-515.
- Bendayan, R., Lee, G., et Bendayan, M. 2002. «Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood-brain barrier». *Microscopy research and technique*, vol. 57, no. 5, p. 365-380.

- Bezombes, C., Maestre, N., Laurent, G., Levade, T., Bettaieb, A. et Jaffrezou, J.P. 1998. «Restoration of TNF-alpha-induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-glycoprotein blocker PSC833». *Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 12, no. 1, p. 101-109.
- Biedler, J.L. et Riehm, H. 1970. «Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro : cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies». *Cancer Research*, vol. 30, no. 4, p. 1174-1184.
- Bist, A., Fielding, P. E., et Fielding, C. J. 1997. "Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 20, p. 10693-10698.
- Bonhomme-Faive, L., Pelloquin, A., Tardivel, S., Urien, S., et Mathieu, M. C. 2002. «Recombinant interleukin-2 treatment decreases P-glycoprotein activity and paclitaxel metabolism in mice». *Anti-cancer Drug*, vol. 13, no. 1, p. 51-57.
- Borst, P., et Elferink, R. O. 2002. "Mammalian ABC transporters in health and disease". *Annual review of biochemistry*, vol. 71, p. 537-592.
- Bosch, I., et Croop, J. 1996. "P-glycoprotein multidrug resistance and cancer". *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1288, no. 2, p.F37-F54.
- Boscoboinik, D., Debanne, M.T., Stafford, A.R., Jung, C.Y., Gupta, R.S. et Epand, R.M. 1990. «Dimerization of the P-glycoprotein in membranes». *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1027, no. 3, p. 225-228.
- Bose et al., 1995. "Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals". *Cell*, vol. 82, no. 3, p. 405-414.
- Cai, C., Zhu, H., et Chen, J. 2004. "Overexpression of caveolin-1 increases plasma membrane fluidity and reduces P-glycoprotein function in Hs578T/Dox". *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 320, no. 3, p. 868-874.
- Cai, C., et Chen, J. 2004. "Overexpression of caveolin-1 induces alteration of multidrug resistance in Hs578T breast adenocarcinoma cells". *Journal international du cancer*, vol. 111, no. 4, p. 522-529.
- Callen, D. F., Baker, E., Simmer, R. N., Seshadri, R., et Roninson, I. B. 1987. "Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1". *Human Genetics*, vol. 77, no. 2, p. 142-144.
- Capozza, F., Williams, T. M., Schubert, W., McClain, S., Bouzahzah, B., Sotgia, F., et Lisanti, M. P. 2003. "Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-

- induced epidermal hyperplasia and tumor formation". *The American journal of pathology*, vol. 162, no. 6, p. 2029-2039.
- Castro, A. F., et Altenberg, G. A. 1997. "Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein". *Biochemical Pharmacology*, vol. 53, no. 1, p. 89-93.
- Chen, C. J., Chin, J. D., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., et Roninson, I. B. 1986. «Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells». *Cell*, vol. 47, no. 3, p.381-389.
- Chin, J.E., Soffir, R., Noonan, K.E., Choi, K., et Roninson, I.B. 1989. «Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family». *Molecular and cellular biology*, vol. 9, no. 9, p. 3808-3820.
- Chong, A.S.F., Markham, P.N., Gebel, H.M., Bines, S.D., et Coon, J.S. 1993. «Diverse multidrug-resistance-modification agents inhibit cytolytic activity of natural killer cells». *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, vol. 36, no. 2, p. 133-139.
- Cohen, A. W., Park, D. S., Woodman, S. E., Williams, T. M., Chandra, M., Shirani, J., Pereira, de Souza, A., Kitsis, R. N., Russell, R. G., Weiss, L. M., Tang, B., Jelicks, L. A., Factor, S. M., Shtutin, V., Tanowitz, H. B., et Lisanti, M. P. 2003a. "Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts". *American journal of physiology: Cell physiology*, vol. 284, no. 2, p. C457-C474.
- Cohen, A. W., Razani, B., Wang, X. B., Combs, T. P., William, T. M., Scherer, P. E., et Lisanti, M. P. 2003b. "Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *American journal of physiology: Cell physiology*, vol. 285, no. 1, p. C222-C235.
- Comerford, K. M., Wallace, T. J., Karhausen, J., Louis, N. A., Montalto, M. C., et Colgan, S. P. 2002. "Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene". *Cancer Research*, vol. 62, no. 12, p. 3387-3394.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R., et Melamed, M.R. 1990. «Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues». *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, vol. 38, no. 9, p. 1277-1287.
- Couet, J., Sargiacomo, M., et Lisanti, M.P. 1997. «Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 48, p. 30429-30438.



- Dano, K. 1973. «Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells». *Biochimica et biophysica acta*, vol. 323, no. 3, p. 466-483.
- Dean, M., Hamon, Y., et Chimini, G. 2001. «The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily». *Journal of lipid research*, vol. 42, no. 7, p. 1007-1017.
- Demeule, M., Wenger, R., et Béliveau, R. 1997. «Molecular interaction of cyclosporin A with P-glycoprotein. Photolabeling with cyclosporin derivatives». *The Journal of biological chemistry*, vol., 272, no. 10, p. 6647-6652.
- Demeule, M., Jodoin, J., Beaulieu, É., Brossard, M., et Béliveau, R. 1999. «Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues». *FEBS Letters*, vol. 442, no. 2-3, p. 208-214.
- Demeule, M., Jodoin, J., Gingras, D., et Béliveau, R. 2000b. «P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries». *FEBS Letters*, vol. 466, no. 2-3, p. 219-224.
- Demeule, M., Shedid, D., Beaulieu, É., Del Maestro, R.F., Moghrabi, A., Ghosn, P.B., Moumdjian, R., Berthelet, F., et Béliveau, R. 2001b. «Expression of multidrug resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors». *Journal international du cancer*, vol. 93, no. 1, p. 62-66.
- Devault, A., et Gros, P. 1990. «Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. » *Molecular and cellular biology*, vol. 10, no. 4, p. 1652-1663.
- Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., et Ambudkar, S.V. 1997. «Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 20, p. 10594-10599.
- Di Pietro, A., Conseil, G., Perez-Victoria, J. M., Dayan, G., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Steinfels, E., Jault, J. M., de Wet, H., Maitrejean, M., Comte, G., Boumendjel, A., Mariotte, A. M., Dumontet, C., McIntosh, D. B., Goffeau, A., Castanys, S., Gamarro, F., et Barron, D. 2002. «Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters». *Cellular and molecular life sciences*, vol. 59, no. 2, p. 307-322.
- Drab, M., Verkake, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H., et Kurzchalia, T. V. 2001. «Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice». *Science*, vol. 293, no. 5539, p. 2449-2452.
- Durr, D., Stieger, B., Kullak-Ublick, G. A., Rentsch, K. M., Steinert, H. C., Meier, P. J., et Fattinger, K. 2000. «St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and

- intestinal and hepatic CYP3A4". *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 68, no. 6, p. 598-604.
- Edwards, D. J., Fitzsimmons, M. E., Schuetz, E. G., Yasuda, K., Ducharme, M. P., Warbasse, L. H., Woster, P. M., Schuetz, J. D., et Watkins, P. 1999. "6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein". *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 65, no. 3, p. 237-244.
- Engelman, J. A., Wykoff, C. C., Yasuhara, S., Song, K. S., Okamoto, T., et Lisanti, M. P. 1997. "Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth". *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 26, p. 16374-16381.
- Engelman, J. A., Zhang, X. L., et Lisanti, M. P. 1998a. "Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers". *FEBS Letters*, vol. 436, no. 3, p. 403-410.
- Engelman, J. A., Zhang, X., Galbiati, F., Volonte, D., Sotgia, F., Pestell, R. G., Minetti, C., Scherer, P. E., Okamoto, T., et Lisanti, M. P. 1998b. "Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy". *American journal of human genetics*, vol. 63, no. 6, p. 1578-1587.
- Engelman, Zhang et Lisanti, 1999. "Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines". *FEBS Letters*, vol. 448, no. 2-3, p. 221-230.
- Evans, A. M. 2000. "Influence of dietary components of the gastrointestinal metabolism and transport of drugs". *Therapeutic drug monitoring*, vol. 22, no. 1, p. 131-136.
- Fielding, C. J., Bist, A., et Fielding, P. E. 1999. "Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts". *Biochemistry*, vol. 38, no. 8, p. 2506-2513.
- Fielding, P. E., et Fielding, C. J. 1995. "Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol". *Biochemistry*, Vol. 34, no. 44, p. 14288-14292.
- Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M.M., et Pastan, I. 1987. «Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 1, p. 265-269.
- Ford, J. M., et Hait, W. N. 1990. "Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer". *Pharmacological reviews*, vol. 42, no. 3, p. 155-199.

- Fromm, M. 2004. "Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers". *Trends in pharmacological sciences*, vol. 25, no. 8, p.423-429.
- Fromm, M. F. 2002. «The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans». *Advanced drug delivery reviews*, vol. 54, no. 10, p. 1295-1310.
- Fugh-Berman, A., et Ernst, E. 2001. "Herb-drug interactions: review and assessment of report reliability". *British journal of clinical pharmacology*, vol. 52, no. 5, p. 587-595.
- Fugh-Berman, A. 2000. "Herb-drug interactions". *Lancet*, vol. 355, no. 9198, p. 134-138.
- Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J. A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R. G., et Lisanti, M. P. 1998. «Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade». *The EMBO journal*, vol. 17, no. 22, p. 6633-6648.
- Garrigues, A., Escargueil, A. E., et Orlowski, S. 2002. «The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 16, p. 10347-10352.
- Goldman, B. 2003. «Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer?». *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95, no. 4, p. 255-257.
- Gollapudi, S., et Gupta, S. 2001. «Anti-P-glycoprotein antibody-induced apoptosis of activated peripheral blood lymphocytes: a possible role of P-glycoprotein in lymphocyte survival». *Journal of clinical immunology*, vol. 21, no. 6, p. 420-430.
- Gottesman, M. M., Fojo, T., et Bates, S. E. 2002. "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters". *Nature reviews*, vol. 2, no. 1, p. 48-58.
- Gottesman, M. M. 2002. "Mechanisms of cancer drug resistance". *Annual review of medicine*, vol. 53, p. 615-627.
- Gottesman, M. M., et Pastan, I. 1993. «Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter». *Annual review of biochemistry*, vol. 62, p. 385-427.
- Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schoenlein, P. V., Germann, U. A., et Pastan, I. 1995. «Genetic analysis of the multidrug transporter». *Annual review of genetics*, vol. 29, p. 607-649.
- Graf, G. A., Connell, P. M., van der Westhuyzen, D. R., et Smart, E. J. 1999. "The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae". *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 17, p. 12043-12048.

- Gros, P., Ben Neriah, B., Croop, J. M., et Housman, D. E. 1986. "Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance". *Nature*, vol. 323, no. 6090, p. 728-731.
- Gros, P., Croop, J. M., et Housman, D. E. 1986. "Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins". *Cell*, vol. 47, no. 3, p. 371-380.
- Gros, P., Raymond, M., Bell, J., et Housman, D. E. 1988. "Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family". *Molecular and cellular biology*, vol. 8, no. 7, p. 2770-2778.
- Gupta, R. S., Murray, W., et Gupta, R. 1988. "Cross resistance pattern towards anticancer drugs of a human carcinoma multidrug-resistant cell line". *British journal of cancer*, vol. 58, no. 4, p. 441-447.
- He, K., Iyer, K. R., Hayes, R. N., Sinz, M. W., Woolf, T. F., et Holenberg, P. F. 1998. "Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice". *Chemical research in toxicology*, vol. 11, no. 4, p. 252-259.
- Hennessy, M., Kelleher, D., Spiers, J. P., Barry, M., Kavanagh, P., Back, D., Mulcahy, F., et Feely, J. 2002. "St Johns wort increases expression of P-glycoprotein: implications for drug interactions". *British journal of clinical pharmacology*, vol. 53, no. 1, p. 75-82.
- Herreros, J., Ng, T., et Schiavo, G. 2001. "Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons". *Molecular biology of the cell*, vol. 12, no. 10, p. 2947-2960.
- Higgins, C. F., Callaghan, R., Linton, K. J., Rosenberg, M. F., et Ford, R. C. 1997. « Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein ». *Seminars in cancer biology*, vol. 8, no. 3, p. 135-142.
- Higgins, C. F., et Gottesman, M. M. 1992. "Is the multidrug transporter a flippase?" *Trends in biochemical sciences*, vol. 17, no. 1, p. 18-21.
- Hinrichs, J. W., Klappe, K., Hummel, I., et Kok, J. W. 2004. "ATP-binding cassette transporters are enriched in non-caveolar detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains (DIGs) in human multidrug-resistant cancer cells". *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 7, p. 5734-5738.
- Hulit, J., Bash, T., Fu, M., Galbiati, F., Albanese, C., Sage, D. R., Schlegel, A., Zhurinsky, J., Shtutman, M., Benze'ev, A., Lisanti, M. P., et Pestell, R. G. 2000. "The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1". *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 28, p. 21203-21209.

- Hurlstone, F. L., Reid, G., Reeves, J. R., Fraser J., Strathdee, G., Rahilly, M., Parkinson, E. K., et Black, D. M. 1999. "Analysis of the caveolin-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines". *Oncogene*, vol. 18, no. 10, p. 1881-1890.
- Ikezu, T., Ueda, H., Trapp, B. D., Nishiyama, K., Sha, J. F., Volonté, D., Galbiati, F., Byrd, A. L., Bassell, G., Seriwaza, H., Lane, W. S., Lisanti, M. P., et Okamoto, T. 1998. « Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain : differential expression of caveolin-1-2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types ». *Brain Research*, vol. 804, no. 2, p. 177-192.
- Ioannides, C. 2002. "Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs". *Xenobiotica*, vol. 32, no. 6, p. 451-478.
- Jetté, L., Murphy, G. F., Leclerc, J. M., et Béliveau, R. 1995. « Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries ». *Biochemical Pharmacology*, vol. 50, no. 10, p. 1701-1709.
- Jetté, L., Potier, M., et Béliveau, R. 1997. "P-glycoprotein is a dimer in the kidney and brain capillary membranes : effect of cyclosporin A and SDZ-PSC 833". *Biochemistry*, vol. 36, no. 45, p. 13929-13937.
- Jetté, L., Têtu, B., et Béliveau, R. 1993. "High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries". *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1150, no. 2, p. 147-154.
- Jin, S., et Scotto, J. W. 1998. « Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y ». *Molecular and cellular biology*, vol. 18, no. 7, p. 4377-4384.
- Jodoin, J., Demeule, M., Fenart, L., Cecchelli, R., Farmer, S., Linton, K. J., Higgins, C. F., et Béliveau, R. 2003. « P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins". *Journal of neurochemistry*, vol. 87, no. 4, p. 1010-1023.
- Jodoin, J., Demeule, M., et Béliveau, R. 2002. « Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols ». *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1542, no. 1-3, p. 149-159.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Tainton, K. M., Smyth, M. J. 2000. « A role for P-glycoprotein in regulating cell death ». *Leukemia and lymphoma*, vol. 38, no. 1-2, p. 1-11.
- Juliano, R. L., et Ling, V. 1976. « A surface glycoprotein modulation drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants ». *Biochimica et biophysica acta*, vol. 455, no. 1, p. 152-162.

- Kane, S. E., Matsumoto, L., Metz, M. Z., Donohue, C. A., Lingeman, R. G., Lin, S. W., et Doroshow, J. H. 2001. "MDR1 bicistronic vectors: analysis of selection stringency, amplified gene expression, and vector stability in cell lines". *Biochemical Pharmacology*, vol. 62, no. 6, p. 693-704.
- Karssen, A. M., Meijer, O. C., van der Sandt, I. C., Lucassen, P. J., de Lange, E. C., de Boer, A. G., et de Kloet, E. R. et al., 2001. "Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain". *Endocrinology*, vol. 142, no. 6, p. 2686-2694.
- Kawaguchi, H., Matsui, Y., Watanabe, Y., et Takakura, Y. 2004. "Effect of interferon-gamma on the pharmacokinetics of digoxin, a P-glycoprotein substrate, intravenously injected into the mouse". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 308, no. 1, p. 91-96.
- Kim, S. W., Kwon, H. Y., Chi, D. W., Shim, J. H., Park, J. D., Lee, Y. H., Pyo, S., et Rhee, D. K. 2003. "Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by ginsenoside Rg(3)". *Biochemical Pharmacology*, vol. 65, no. 1, p. 75-82.
- Kleiner, H. E., Vulimiri, S. V., Starost, M. F., Reed, M. J., et DiGiovanni, J. 2002. "Oral administration of the citrus coumarin, isopimpinellin, blocks DNA adduct formation and skin tumor initiation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice". *Carcinogenesis*, vol. 23, no. 10, p. 1667-1675.
- Klimecki, W. T., Futscher, B. W., Grogan, T. M., et Dalton, W. S. 1994. « P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers ». *Blood*, vol. 83, no. 9, p. 2451-2458.
- Kofinas, C., Chinou, I., Loukis, A., Harvala, C., Roussakis, C., Maillard, M., et Hostettmann, K. 1998. « Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line". *Planta Medica*, vol. 64, no. 2, p. 174-176.
- Koleske, A. J., Baltimore, D., et Lisanti, M. P. 1995. « Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 5, p. 1381-1385.
- Labrecque, L., Royal, I., Surprenant, D. S., Patterson, C., Gingras, D., et Béliveau, R. 2003. « Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol ». *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 1, p. 334-347.
- Laemmli, U., K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 72, no. 11, p. 4288-4292.

- Lam, F. C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A. B., Renoir, J. M., Sharom, F. J., et Reiner, P. B. 2001. « beta-amyloid efflux mediated by P-glycoprotein ». *Journal of neurochemistry*, vol. 76, no. 4, p. 1121-1128.
- Lavie, Y., Fiucci, G., Czarny, M., et Liscovitch, M. 1999. « Change in membrane microdomains and caveolae constituents in multidrug-resistant cancer cells ». *Lipids*, vol. 34, p. S57-S63.
- Lavie, Y., et Liscovitch, M. 2000. "Change in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences". *Glycoconjugate journal*, vol. 17, no. 3-4, p. 253-259.
- Lavie, Y., Fiucci, G., et Liscovitch, M. 1998. "Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells". *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 49, p. 32380-32383.
- Lavie, Y., Fiucci, G., et Liscovitch, M. 2001. "Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells : functional implications". *Advanced drug delivery reviews*, vol. 49, no. 3, p. 317-323.
- Lee, C. G., Gottesman, M. M., Cardarelli, C. O., Ramachandra, M., Jeang, K. T., Amdukar, S. V., Pastan, I., et Dey, S. 1998. « HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter ». *Biochemistry*, vol. 37, no. 11, p. 3594-3601.
- Lee, H., Park, D. S., Razani, B., Russell, R. G., Pestell, R. G., et Lisanti, M. P. 2002b. « Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer : caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia ». *The American journal of pathology*, vol. 161, no. 4, p. 1357-1369.
- Liang, Y., Meleady, P., Cleary, I., McDonnell, S., Connolly, L., et Clynes, M. 2001. "Selection with melphalan or paclitaxel (Taxol) yields variants with different patterns of multidrug resistance, integrin expression and in vitro invasiveness". *European journal of cancer: Oxford, England*, vol. 37, no. 8, p. 1041-1052.
- Ling, V., et Thompson, L. H. 1974. "Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine". *Journal of cellular physiology*, vol. 83, no. 1, p. 103-116.
- Liou, J. Y., Deng, W. G., Gilroy, D. W., Shyue, S. K., et Wu, K. K. 2001. « Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts ». *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 37, p. 34975-34982.
- Liscovitch, M., et Lavie, Y. 2000. « Multidrug resistance : a role for cholesterol efflux pathway ? ». *Trends in biochemical sciences*, vol. 25, no. 11, p. 530-534.



- Loo, T. W., Bartlett, M. C., et Clarke, D. M. 2003. "Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites". *The Journal of biological chemistry*, vol. 50, no. 50, p. 50136-50141.
- Loo, T. W., Bartlett, M. C., et Clarke, D. M. 2004. "The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium". *Biochemistry*, vol. 43, no. 38, p. 12081-12089.
- Loscher, W., et Potschka, H. 2002. "Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 301, no. 1, p. 7-14.
- Luker, G. D., Nilsson, K. R., Covey, D. F., et Piwnica-Worms, D. 1999. "Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol". *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 11, p. 6979-6991.
- Luker, G. D., Pica, C. M., Kumar, A. S., Covey, D. F., et Piwnica-Worms, D. 2000. "Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains". *Biochemistry*, vol. 39, no. 29, p. 7651-7661.
- Lum, B. L., Fisher, G. A., Brophy, N. A., Yahanda, A. M., Adler, K. M., Kaubisch, S., Halsey, J., et Sikic, B. I. 1993. "Clinical trials of modulation of multidrug resistance. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations". *Cancer*, vol. 72, no. 11, p. 3502-3514.
- Lum, B. L., Gosland, M. P., Kaubish, S., Sikic, B. I. 1993. "Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene". *Pharmacotherapy*, vol. 13, no. 2, p. 88-109.
- Macfarland, A., Abramovich, D. R., Ewen, S. W., et Pearson, C. K. 1994. "Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta". *The Histochemical journal*, vol. 26, no. 5, p. 417-423.
- Metherall, J. E., Li, H., et Waugh, K. 1996. "Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol biosynthesis". *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 5, p. 2634-2640.
- Modok, S., Heyward, C., et Callaghan, R. 2004. «P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment». *Journal of lipid research*, vol. 45, no. 10, p. 1910-8.
- Montesano, R., Roth, J., Robert, A., et Orci, L. 1982. «Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins ». *Nature*, vol. 296, no. 5858, p. 651-653.



- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V., et Simons, K. 1995. "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 22, p. 10339-10343.
- Ohnishi, A., Matsuo, H., Yamada, S., Takanaga, A., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ohtani, H., Sawada, Y. 2000. "Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine in Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4". *British journal of Pharmacology*, vol. 130, no. 6, p. 1369-1377.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., et Lisanti, M. P. 1998. "Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing preassembled signaling complexes at the plasma membrane". *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 10, p. 5419-5422.
- Oude Elferink, R. P., et Zadina, J. 2001. "MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides". *Peptides*, vol. 22, no. 12, p. 2015-2020.
- Pauli-Magnus, C., et Kroetz D. L. 2004. "Functional implication of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1)". *Pharmaceutical Research*, vol. 21, no. 6, p. 904-913.
- Pang, A., Au, W. Y., et Kwong, Y. L. 2004. "Caveolin-1 gene is coordinately regulated with the multidrug resistance 1 gene in normal and leukemic bone marrow". *Leukemia research*, vol. 28, no. 9, p. 973-977.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., et Yang, J. 2001. "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER". *Nature cell biology*, vol. 3, no. 5, p. 473-483.
- Peng, Z., Xiao, Z., Wang, Y., Liu, P., Cai, Y., Lu, S., Feng, W., et Han, Z. C. 2004. "Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells". *Cancer gene therapy*, vol. 11, no. 11, p. 707-712.
- Racine, C., Belanger, M., Hirabayashi, H., Boucher, M., Chakir, J., et Couet, J. 1999. "Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines". *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 255, no. 3, p. 580-600.
- Randolph, G. J. 2001. "Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators". *Seminars in immunology*, vol. 13, no. 5, p. 267-274.
- Raymond, M., et Gros, P. 1989. "Mammalian multidrug-resistance gene : correlation of exon organization with structural domains and duplication of an ancestral gene". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 17, p. 6488-6492.
- Razani, B., Woodman, S. E., et Lisanti, M. P. 2002. "Caveolae : from cell biology to animal physiology". *Pharmacological reviews*, vol. 54, no. 3, p. 431-467.

- Razani, B., et Lisanti, M. P. 2001b. « Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease ». *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 11, p. 1553-1561.
- Razini, B., Schlegel, A., et Lisanti, M. P. 2000. « Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy ». *Journal of Cell Science*, vol. 113, no. 12, p. 2103-2109.
- Razani, B., et Lisanti, M. P. 2001a. « Caveolins and caveolae : molecular and functional relationship ». *Experimental Cell Research*, vol. 271, no. 11, p. 36-44.
- Raderer, M., et Scheithauer, W. 1993. "Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. A literature review". *Cancer*, vol. 72, no. 12, p. 3553-3563.
- Régina, A., Demeule, M., Laplante, A., Jodoin, J., Dagenais, C., Berthelet, F., et Béliveau, R. 2001. « Multidrug resistance in brain tumors : roles of the blood-brain barrier ». *Cancer metastasis reviews*, vol. 20, no. 1-2, p. 13-25.
- Régina, A., Demeule, M., Bérubé, A., Moumdjian, R., Berthelet, F., et Béliveau, R. 2003. « Differences in multidrug resistance phenotype and matrix metalloproteinases activity between endothelial cells from normal brain and glioma ». *Journal of neurochemistry*, vol. 84, no. 2, p. 316-324.
- Régina, A., Jodoin, J., Khoeir, P., Rolland, Y., Berthelet, F., Moumdjian, R., Fenart, L., Cecchelli, R., Demeule, M., et Béliveau, R. 2004. « Down-regulation of caveolin-1 in glioma vasculature: modulation by radiotherapy ». *Journal of neuroscience research*, vol. 75, no. 2, p. 291-299.
- Robinson, L. J., Roberts, W. K., Ling, T. T., Lamming, D., Sternberg, S. S., et Roepe, P. D. 1997. « Human MDR1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts ». *Biochemistry*, vol. 36, no. 37, p. 11169-11178.
- Romiti, N., Tongiani, R., Cervelli, F., et Chieli, E. 1998. "Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes". *Life Sciences*, vol. 62, no. 25, p. 2349-2358.
- Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M., et Pastan, I. 1986. « Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 12, p. 4538-4542.
- Rosenberg, M., Cllaghan, R., Ford, C. R., et Higgins, C. F. 1997. « Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and images analysis ». *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 16, p. 10 685-10 694.

- Rosenberg, M. F., Kamis, A. B., Callaghan, R., Higgins, C. F., et Ford, R. C. 2003. "Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding". *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 18, p. 8294-8299.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., et Anderson, R. G. 1992. "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats". *Cell*, vol. 68, no. 4, p. 673-682.
- Rothnie, A., Theron, D., Soceneantu, L., Martin, C., Traika, M., Berridge, G., Higgins, C. F., Devaux, P. F., et Callaghan, R. 2001. "The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence". *European biophysics journal*, vol. 30, no. 6, p. 430-442.
- Rowinsky, E. K., Smith, L., Wang, Y. M., Chaturvedi, P., Villalona, M., Campbell, E., Aylesworth, C., Eckhardt, S. G., Hammond, L., Kraynak, M., Drengler, R., Stephenson, J., Harding, Jr. M. W., et Von Hoff, D. D. 1998. "Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel in combination with biricodar, a novel agent that reverses multidrug resistance conferred by overexpression of both MDR1 and MRP". *Journal of Clinical Oncology*, vol. 16, no. 9, p. 2964-2976.
- Ruetz, S., et Gros, P. 1994. « Phosphatidylcholine translocase : a physiological role for the *mdr2* gene ». *Cell*, vol. 77, no. 7, p. 1071-1081.
- Sager, R., Sheng, S., Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Zou, Z., Stenman, G., Swisshelm, K., Chen, Z., Hendrix, M. J., et Pemberton, P. 1994. "RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm". *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 59, p. 537-546.
- Sakaeda, T., Nakamura, T., Hirai, M., Kimura, T., Wada, A., Yagami, T., Kobayashi, H., Nagata, S., Okamura, N., Yoshikawa, T., Shirakawa, T., Gotoh, A., Matsuo, M., et Okumura, K. 2002. "MDR1 up-regulated by apoptotic stimuli suppresses apoptotic signaling". *Pharmaceutical Research*, vol. 19, no. 9, p. 1323-1329.
- Scherer, P. E., Lisanti, M. P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastik, C. C., et Lodish, H. F. 1994. "Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles". *The Journal of Cell Biology*, vol. 127, no. 5, p. 1233-1243.
- Scherer, P. E., Lewis, R. Y., Volonte, D., Engelman, J. A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D. S., van Donselaar, E., Peters, P., et Lisanti, M. P. 1997. "Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo". *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 46, p. 29337-29346.

- Schinkel, A. H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P., Bems, A. J., et Borst, P. 1994. "Disruption of the mouse *mdrla* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs". *Cell*, vol. 77, no. 4, p. 491-502.
- Schinkel, A. H. 1999. "P-glycoprotein a gatekeeper in the blood-brain barrier". *Advanced drug delivery reviews*, vol. 36, no. 2-3, p. 179-194.
- Schinkel, A. H., et Jonker, J. W. 2003. "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview". *Advanced drug delivery reviews*, vol. 55, no. 1, p. 3-29.
- Schlegel, A., et Lisanti, M. P. 2000. "A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo". *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 28, p. 21605-21617.
- Schmiedlin-Ren, P., Edwards, D. J., Fitzsimmons, M. E. He, K., Lown, K. S., Woster, P. M., Rahman, A., Thummel, K. E., Fisher, J. M., Hollenberg, P. F., et Watkins, P. B. 1997. "Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocytes CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins". *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, vol. 25, no. 11, p. 1228-1233.
- Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., et Allard, J. 1994. "Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of selected macromolecules". *The Journal of Cell biology*, vol. 127, no. 5, p. 1217-1232.
- Schnitzer, J. E. 2001. "Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo". *Advanced drug delivery reviews*, vol. 49, no. 3, p. 265-280.
- Schubert, W., Frank, P. G., Razani, B., Park, D. S., Chow, C. W., et Lisanti, M. P. 2001. « Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo ». *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 52, p. 48619-48622.
- Seegers, U., Potschka, H., et Loscher, W. 2002. "Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions and in the kainate model of temporal lobe epilepsy". *Epilepsy Research*, vol. 51, no. 3, p. 257-268.

- Shapiro, A. B., Corder, A.B., et Ling, V. 1997. "P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer". *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 250, no. 1, p. 115-21.
- Shaul, P. W., et Anderson, R. G. 1998. "Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction". *The American Journal of Physiology*, vol. no. 5, 275, p. L843-L851.
- Shin, J. S., Gao, Z., et Abraham, S. N. 2000. « Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells ». *Science*, vol. 289, no. 5480, p. 785-788.
- Simons, K., et Toomre, D. 2000. « Lipid rafts and signal transduction ». *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 1, no. 1, p. 31-39.
- Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., et Lisanti, M. P. 1999. "Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction". *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 11, p. 7289-7304.
- Smart, E. J., Ying, Y., Donzell, W. C., et Anderson, R. G. 1996. "A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane". *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 46, p. 29427-29435.
- Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groem, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., Ottenhof, R., van der Lugt, M. A., van der Valk, M. A., Offerhof, G. J., Berns, A. J., et Broost, P. 1993. « Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to the liver ». *Cell*, vol. 75, no. 3, p. 451-462.
- Song, K. S., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Parenti, M., et Lisanti, M. P. 1997. "Targeting of a G alpha subunit (Gi 1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes : clarifying the role of N-myristoylation". *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, vol. 43, no. 3, p. 293-303.
- Stewart, P. A., Béliveau, R., et Rogers, K. A. 1996. « Cellular localization of P-glycoprotein in brain versus gonadal capillaries ». *The journal of histochemistry and cytochemistry*, vol. 44, no.7, p. 679-685.
- Sugawara, I., Hamada, H., Tsuru, T., et Mori, S. 1990. « Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK 16 monoclonal antibody in endothelial cells of the brain and the spinal cord ». *Japanese journal of cancer research: Gann*, vol. 81, no. 8, p. 727-730.
- Sukhai, M., et Piquette-Miller, M. 2000. « Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals ». *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 2, p. 268-280.

- Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F., et Lisanti, M. P. 1996. "Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle". *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 4, p. 2255-2261.
- Tang, F., Ouyang, H., Yang, J. Z., et Borchardt, R. T. 2004. "Bidirectional transport of rhodamine 123 and Hoechst 33342, fluorescence probes of the binding sites on P-glycoprotein, across MDCK-MDR1 cell monolayers". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93, no. 5, p. 1185-1194.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., et Willingham, M. C. 1987. « Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 21, p. 7735-7738.
- Thomas, H., et Coley, H. M. 2003. « Overcoming multidrug resistance in cancer : an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein ». *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*, vol. 10, no. 2, p. 159-165.
- Tishler, D. M., Weinberg, K. I., Hinton, D. R., Barbaro, N., Annett, G. M., et Raffel, C. 1995. "MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy". *Epilepsia*, vol. 36, no. 1, p. 1-6.
- Toth, K., Vaughan, M. M., Peress, N. S., Slocum, H. K., et Rustum, Y. M. 1996. "MDR1 P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors". *The American journal of pathology*, vol. 149, no. 3, p. 853-858.
- Troost, J., Lindenmaier, H., Haefeli, W. E., et Weiss, J. 2004. "Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells". *Molecular pharmacology*, vol. 66, no. 5, p. 1332-1339.
- Uchiyama-Kokubu, N., Naito, M., Nakajima, M., et Tsuruo, T. 2004. "Transport of somatostatin and substance P by human P-glycoprotein". *FEBS Letters*, vol. 574, no. 1-3, p. 55-61.
- Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V., et Riordan, J. R. 1986. « The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein ». *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 141, no. 3, p. 956-962.
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M., et Pastan, I. 1987. « Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 9, p. 3004-3008.

- Uhr, M., Holsboer, F., et Muller, M. B. 2002. "Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins". *Journal of neuroendocrinology*, vol. 14, no. 9, p. 753-759.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y., et Smart, E. J. 1998. "Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking". *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 11, p. 6525-6532.
- Valverde, M. A., Bond, T. D., Hardy, S. P., Taylor, J. C., Higgins, C. F., Altamirano, J., et Alvarez-Leefmans, F. J. 1996. "The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease". *The EMBO journal*, vol. 15, no. 17, p. 4460-4468.
- van der Valk, P., van Kalken, C. K., Ketelaars, H., Broxterman, H. J., Scheffer, G., Kuiper, C. M., Tsuruo, T., Lankelma, J., Meijer, C. J., et Pinedo, H. M. 1990. "Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule". *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 1, no. 1, p. 56-64.
- van Kalken, C. K., Giaccone, G., van der Valk, P., Kuiper, C. M., Hadisaputro, M. M., Bosma, S. A., Scheper, R. J., Meijer, C. J., et Pinedo, H. M. 1992. "Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus". *The American journal of pathology*, vol. 141, no. 5, p. 1063-1072.
- van Kalken, C. K., Broxterman, H. J., Pinedo, H. M., Feller, N., Dekker, H., Lankelma, J., et Giaccone, G. 1993. "Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein". *British Journal of Cancer*, vol. 67, no. 2, p. 284-289.
- Vanoye, C. G., Altenberg, G. A., et Reuss, L. 1997. «P-glycoprotein is not a swelling-activated Cl-channel; possible role as a Cl-channel regulator ». *Journal of Physiology*, vol. 502, no. 2, p. 249-258.
- Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M., Benagiano, V., Tauer, U., Roncali, L., et Bertossi, M. 2002a. « Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels ». *The journal of histochemistry and cytochemistry*, vol. 50, no. 12, p. 1671-1676.
- Vogelgesang, S., Cascorbi, I., Schroeder, E., Pahnke, J., Kroemer, H. K., Siegmund, W., Kunert-Keil, C., Walker, L. C., et Warzok, R. W. 2002. "Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans". *Pharmacogenetics*, vol. 12, no. 7, p. 535-541.
- Walter-Sack et Klotz, 1996. "Influence of diet and nutritional status on drug metabolism". *Clinical pharmacokinetics*, vol. 31, no. 1, p. 47-64.

- Wandel, C., Kim, R. B., Kajiji, S., Guengerich, P., Wilkinson, G. R., et Wood, A. J. 1999. "P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies". *Cancer Research*, vol. 59, no. 16, p. 3944-3948.
- Wang, E., Casciano, C. N., Clement, R. P., et Johnson, W. W. 2000. « Cholesterol interaction with the daunorubicin binding site of P-glycoprotein ». *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 276, no. 3, p. 909-916.
- Wang, E. J., Casciano, C. N., Clement, R. P., et Johnson, W. W. 2001a. "Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen". *Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 4, p. 432-438.
- Wang, E. J., Barecki-Roach, M., et Johnson, W. W. 2002a. "Elevation of P-glycoprotein function by a catechin in green tea". *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 297, no. 2, p. 412-418.
- Wartenberg, M., Ling, F. C., Muschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., Petrat, K., Putz, V., Hescheler, J., et Sauer, H. 2003. "Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species". *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 17, no. 3, p. 503-505.
- Wilkinson, G. R. 1997. "The effects of diet, aging and disease-states on presystemic elimination and oral drug bioavailability in humans". *Advanced drug delivery reviews*, vol. 27, no. 2-3, p. 129-159.
- Williams, T. M., Cheung, M. W., Park, D. S., Razani, B., Cohen, A. W., Muller, W. J., Di Vizio, D., Chopra, N. G., Pertell, R. G., et Lisanti, M. P. 2003. « Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice ». *Molecular biology of the cell*, vol. 14, no. 3, p. 1027-1042.
- Wolf, A. A., Fujinaga, Y., et Lencer, W. I. 2002. "Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol". *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 18, p. 16249-16256.
- Xu, D., Kang, H., Fischer, M., et Juliano, R. L. 2004. "Strategies for inhibition of MDR1 gene expression". *Molecular pharmacology*, vol. 66, no. 2, p. 268-275.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., et Ishikawa, Y. 1998. « Caveolin is an activator of insulin receptor signaling ». *The Journal of biological chemistry*, Vol. 273, no. 41, p. 26962-26968.
- Yang, C. S., Galbianti, F., Volonte, D., Horwitz, S. B., et Lisanti, M. P. 1999. "Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in taxol-resistant A549 cells". *FEBS Letters*, vol. 439, no. 3, p. 368-372.



- Yang, C. S., Yang, G. Y., Landau, J. M., Kim, S., et Liao, J. 1998b. « Tea and tea polyphenols inhibit cell proliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression ». *Experimental lung research*, vol. 24, no. 4, p. 629-639.
- Yang, C. S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D., Kuo, M. C., et Schantz, S. P. 1998a. "Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers". *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 7, no. 4, p. 351-354.
- Yang, J. M., Xu, Z., Wu, H., Zhu, H., Wu, X., et Hait, W. N. 2003. "Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells". *Molecular cancer research*, vol. 1, no. 6, p. 420-427.
- Zhou, S. F., Gao, Y. H., Wen, Q. J., Huang, M., Xu, A. L., et Paxton, J. W. 2003. "Interactions of herbs with cytochrome P450". *Drug metabolism reviews*, vol. 35, no. 1, p. 35-98.
- Zhou, S., Lim, L. Y., et Chowbay, B. 2004. « Herbal modulation of P-glycoprotein ». *Drug metabolism reviews*, vol. 36, no. 1, p. 57-104.
- Zhu, H., Cai, C., et Chen, J. 2004. « Suppression of P-glycoprotein gene expression Hs578T/Dox by the overexpression of caveolin-1 ». *FEBS Letters*, vol. 576, no. 3, p. 369-374.